



Ana Catarina Monteiro Dias Antunes

Licenciada em Biologia Celular e Molecular

Avaliação da lesão genética induzida por exposição a radiação ionizante na população Portuguesa

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Genética Molecular e Biomedicina

Orientador: Doutora Octávia Monteiro Gil

Investigadora Auxiliar, IST/ITN – Instituto Superior Técnico,
Universidade Técnica de Lisboa

Júri:

Presidente: Doutor José Paulo Sampaio

Arguente: Doutor António Sebastião Rodrigues



**FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA**

13 de Dezembro de 2012

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Genética Molecular e
Biomedicina
pela Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

Avaliação da lesão genética induzida por exposição a radiação ionizante na população Portuguesa

Ana Catarina Monteiro Dias Antunes

n.º 38450

Licenciada em Biologia Celular e Molecular

13 de Dezembro de 2012

Orientador: **Doutora Octávia Monteiro Gil**, Investigadora Auxiliar, IST/ITN – Instituto Superior Técnico, Universidade Técnica de Lisboa.

COPYRIGHT

Avaliação da lesão genética induzida por exposição a radiação ionizante na população Portuguesa

Copyright: Ana Catarina Monteiro Dias Antunes, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa (FCT/UNL), Universidade Nova de Lisboa (UNL).

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

2012

AGRADECIMENTOS

Finalizado este trabalho, gostaria de agradecer a todos os que contribuíram, directa ou indirectamente, para a sua conclusão.

Agradeço à minha orientadora, Doutora Octávia Monteiro Gil, toda a disponibilidade e orientação durante a realização do trabalho.

Ao Doutor Pedro Vaz, coordenador da Unidade Protecção e Segurança Radiológica e do Grupo de Dosimetria e Radiobiologia, por me ter dado a oportunidade de ingressar neste grupo de trabalho. Agradeço também o incentivo que sempre nos dá e o acreditar que é sempre possível. Obrigado por me ajudar a decidir pela opção a) ou b).

Agradeço em especial a todos os dadores que contribuíram para este trabalho, sem os quais não teria sido possível realizá-lo.

Agradeço ao Professor David Lloyd e à Doutora Elizabeth Ainsbury da Health Protection Agency por terem fornecido o *software* Dose Estimate e por todo o apoio prestado no tratamento dos resultados. Aos dois, muito obrigado.

Um obrigado ao João Cardoso e ao Luis Santos do Laboratório de Metrologia das Radiações Ionizantes pelo apoio prestado na irradiação das amostras.

Um obrigado especial à Vanda porque sem os olhos dela os meus teriam ficado cansados em dobro! Obrigado pelas horas que passaste ao microscópio e por todos os *brainstorming*. Só não precisávamos de tantos chocolates!

Aos meus colegas de almoço: Yuriy, Sílvia, Salvatore, Raul, Vanda e Joana pela descontração das horas de almoço e pelas conversas sem “nexo”!

Ao Raul por gostar tanto de “sushizadas” como eu e por ter resposta para as minhas perguntas de física.

À Joana pelo apoio com o cobalto-60, pelas conversas descontraídas e por nos acompanhar nas “sushizadas”.

Aos meus pais, padrinho e avó pelo apoio, incentivo e ajuda que sempre me deram. À minha mãe pelo contributo especial que teve neste trabalho.

Ao Ricardo pelo carinho que sempre me dedicou e pela paciência infinita.

E a todos aqueles que directa ou indirectamente me ajudaram, incentivaram e que também participaram neste projecto e que eu não mencionei, a todos, muito obrigado.

RESUMO

O uso generalizado de fontes de radiação ionizante em diversas actividades aumenta o risco de exposição accidental de pessoas. A dosimetria biológica desempenha um papel fundamental na estimativa da dose absorvida de um indivíduo, no caso de exposições inesperadas a radiação ionizante, sendo por vezes a única forma de quantificar essa mesma dose. Paralelamente, segundo as recomendações da IAEA, cada laboratório deve possuir a sua curva dose-resposta, uma vez que são diversos os factores que podem influenciar a relação dose-efeito. Neste contexto, na IST/ITN foi realizado um estudo envolvendo 16 dadores saudáveis com vista à obtenção de uma curva dose-resposta *in vitro*, sendo a primeira vez que um estudo desta natureza é realizado em Portugal. Foram analisadas um total de 22395 metafases onde todas as aberrações cromossómicas foram contabilizadas. Para a implementação da curva foram analisados dois *endpoints*, os cromossomas dicêntricos e os cromossomas dicêntricos+anéis, recorrendo a dois *softwares*, o CABAS e o Dose Estimate. Verificou-se que os resultados obtidos com os dois *softwares* eram semelhantes e que as curvas obtidas se ajustavam bem ao modelo linear quadrático: $Y = c + \alpha D + \beta D^2$. Os valores de α obtidos foram de 0,0105 para dicêntricos e de 0,0095 para dicêntricos+anéis. Os valores de β obtidos foram de 0,0480 para dicêntricos e de 0,0536 para dicêntricos+anéis. Realizou-se também uma experiência com três dadores para a validação das curvas dose-resposta. As amostras de sangue dos dadores foram irradiadas com uma dose desconhecida para os operadores e depois de contabilizado o número de dicêntricos e dicêntricos+anéis estimou-se a dose de exposição, utilizando ambas as curvas, verificando-se que esta estava de acordo com a dose real. Estes resultados permitem-nos ter confiança na utilização das curvas implementadas, sempre que seja necessário recorrer à dosimetria biológica para o cálculo de doses.

PALAVRAS-CHAVE: Radiação γ ; Exposição accidental; Dosimetria biológica; Aberrações cromossómicas; Cromossomas dicêntricos; Anéis.

ABSTRACT

The widespread use of ionizing radiation sources in many disciplines increases the risk of overexposure of one or more persons. The biological dosimetry is a methodology for absorbed dose quantification of an individual, in cases of unanticipated exposures to ionizing radiation and being, sometimes, the only way to quantify the dose. According to the IAEA recommendations, each laboratory must have its own dose-response curve, since several factors can influence the dose-effect relationship. In this context, an *in vitro* dose-response curve with 16 healthy donors was performed at the IST/ITN, being the first study on this subject carried out in Portugal. A total of 22395 metaphases were analyzed and all chromosomal aberrations were taking into account. The data for dicentric chromosomes and dicentric chromosomes+rings was fitted to the linear-quadratic model $Y = c + \alpha D + \beta D^2$, using two software, CABAS and Dose Estimate, producing the same results. The α coefficient values obtained were 0.0105 for dicentric and 0.0095 for dicentric+rings. The β coefficient values obtained were 0.0480 for dicentric and 0.0536 for dicentric+rings. Following the establishment of the dose-response curves, a validation experiment was carried out with three individuals whose blood was irradiated with a dose unknown to the operators. Dicentric and dicentric+rings were scored and the real and estimated doses, obtained with the previous dose-response curves, were in agreement. These results give us confidence to apply both dose-response calibration curves in future biological dosimetry requirements.

KEYWORDS: γ -radiation; Accidental exposure; Biological dosimetry; Chromosomal aberrations; Dicentric chromosomes; Rings.

Parte dos resultados apresentados e discutidos no presente trabalho foram apresentados sob a forma de poster na conferência EPRBioDose 2010 (Mandelieu-La-Napoule, França):

- *Implementation of a dose-response curve of γ -radiation for Portuguese population using the chromosomal aberration assay.*

Martins, V., Antunes, A.C., Cardoso, J., Santos, L., Monteiro Gil, O.

- *Cytokinesis-blocked micronucleus assay for a rapid screening in case of an accidental exposure scenario.*

Antunes, A.C., Martins, V., Cardoso, J., Santos, L., Monteiro Gil, O.

Parte dos resultados apresentados e discutidos no presente trabalho foram apresentados sob a forma de poster na conferência ERR 2012 (Vietri sul Mare, Itália):

- *Dose-response curves for Portuguese population: chromosomal aberration and micronucleus assay*

Antunes, A.C., Martins, V., Monteiro Gil, O.

Parte dos resultados apresentados e discutidos no presente trabalho foram apresentados sob a forma de comunicação oral na conferência Proteção 2012 (Lisboa, Portugal):

- *Dose-response curve for γ -radiation using the chromosomal aberration assay*

Martins, V., Antunes, A.C., Monteiro Gil, O.

Foram também publicados dois artigos:

- *Martins, V., Antunes, A.C., Cardoso, J., Santos, L., Monteiro Gil, O. 2011. Influence of age and gender in response to γ -radiation in Portuguese individuals using chromosomal aberration assay – Preliminary findings. Radiation Measurements 46:1000-1003.*
- *Martins, V., Antunes, A.C., Monteiro Gil, O. 2013. Implementation of a dose-response curve for γ -radiation in the Portuguese population using the chromosomal aberration assay. Mutation Research 750:50-54.*

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	- 1 -
1.1. RADIAÇÃO IONIZANTE	- 3 -
1.1.1. <i>Tipos de radiação ionizante</i>	- 4 -
1.1.2. <i>Fontes de radiação ionizante</i>	- 5 -
1.2. EFEITOS BIOLÓGICOS DA RADIAÇÃO IONIZANTE	- 6 -
1.2.1. <i>Lesões no DNA induzidas pela radiação ionizante</i>	- 6 -
1.2.2. <i>Avaliação da lesão genética</i>	- 7 -
1.3. DOSIMETRIA.....	- 8 -
1.3.1. <i>Protecção radiológica</i>	- 9 -
1.3.2. <i>Dosimetria biológica</i>	- 10 -
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	- 13 -
2.1. POPULAÇÃO.....	- 15 -
2.1.1. <i>Colheita das amostras de sangue periférico</i>	- 15 -
2.2. IRRADIAÇÃO IN VITRO.....	- 16 -
2.3. TÉCNICA DAS ABERRAÇÕES CROMOSSÓMICAS.....	- 16 -
2.3.1. <i>Crítérios de leitura</i>	- 17 -
2.4. CONSTRUÇÃO DA CURVA DOSE-RESPOSTA	- 18 -
2.4.1. <i>Validação da curva dose-resposta</i>	- 19 -
2.5. COMPARAÇÃO ENTRE DADORES	- 20 -
3. RESULTADOS	- 21 -
3.1. CURVAS DOSE-RESPOSTA	- 26 -
3.1.1. <i>Validação das curvas dose-resposta</i>	- 28 -
3.2. COMPARAÇÃO ENTRE DADORES	- 29 -
4. DISCUSSÃO	- 33 -
5. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS	- 39 -
6. BIBLIOGRAFIA.....	- 43 -
6.1. REFERÊNCIAS ELECTRÓNICAS.....	- 50 -
ANEXOS.....	

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1.1 – ESQUEMA ILUSTRATIVO DO PODER DE PENETRAÇÃO DE DIFERENTES TIPOS DE RADIAÇÃO IONIZANTE.	4 -
FIGURA 1.2 – MECANISMOS DE ACÇÃO DIRECTA E INDIRECTA NO DNA CAUSADA PELA RADIAÇÃO IONIZANTE	6 -
FIGURA 1.3 – REPRESENTAÇÃO DOS PRINCIPAIS TIPOS DE ABERRAÇÕES CROMOSSÓMICAS.	7 -
FIGURA 1.4 – ESQUEMA REPRESENTATIVO DA FORMAÇÃO DE UM CROMOSSOMA DICÊNTRICO.	8 -
FIGURA 2.1 – ESQUEMA REPRESENTATIVO DO PROCESSO DE IRRADIAÇÃO.	16 -
FIGURA 3.1 – IMAGENS DE METAFASES OBTIDAS E CONTABILIZADAS NO DECORRER DESTE TRABALHO.	23 -
FIGURA 3.2 – CURVA DOSE-RESPOSTA PARA DICÊNTRICOS.	28 -
FIGURA 3.3 – CURVA DOSE-RESPOSTA PARA DICÊNTRICOS+ANÉIS.	28 -
FIGURA 3.4 – COMPARAÇÃO DO NÚMERO DE DICÊNTRICOS POR CÉLULA ENTRE OS DADORES DO SEXO MASCULINO (●) E FEMININO (■).	30 -
FIGURA 3.5 – COMPARAÇÃO DO NÚMERO DE DICÊNTRICOS+ANÉIS POR CÉLULA ENTRE OS DADORES DO SEXO MASCULINO (●) E FEMININO (■).	30 -
FIGURA 3.6 – COMPARAÇÃO DO NÚMERO DE ABERRAÇÕES CROMOSSÓMICAS (AC) POR CÉLULA ENTRE OS DADORES DO SEXO MASCULINO (●) E FEMININO (■).	30 -
FIGURA 3.7 – COMPARAÇÃO DO NÚMERO DE DICÊNTRICOS POR CÉLULA ENTRE OS DADORES DA FAIXA ETÁRIA DOS 20-39 ANOS (■) E DOS 40-59 ANOS (●).	31 -
FIGURA 3.8 – COMPARAÇÃO DO NÚMERO DE DICÊNTRICOS+ANÉIS POR CÉLULA ENTRE OS DADORES DA FAIXA ETÁRIA DOS 20-39 ANOS (■) E DOS 40-59 ANOS (●).	31 -
FIGURA 3.9 – COMPARAÇÃO DO NÚMERO DE ABERRAÇÕES CROMOSSÓMICAS (AC) POR CÉLULA ENTRE OS DADORES DA FAIXA ETÁRIA DOS 20-39 ANOS (■) E DOS 40-59 ANOS (●).	31 -

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1.1 – VALORES MÉDIOS DA DOSE EFECTIVA ANUAL NA POPULAÇÃO MUNDIAL PROVENIENTE DE FONTES DE RADIAÇÃO IONIZANTE DE ORIGEM NATURAL E ARTIFICIAL (ADAPTADO DE UNSCEAR 2008).	- 5 -
TABELA 1.2 – FACTOR DE PONDERAÇÃO PARA OS DIFERENTES TIPOS DE RADIAÇÃO (ADAPTADO DE ICRP, 2007).....	- 9 -
TABELA 1.3 – FACTOR DE PONDERAÇÃO PARA OS DIFERENTES TECIDOS (ADAPTADO DE ICRP, 2007).....	- 9 -
TABELA 1.4 – LIMITES DE DOSE RECOMENDADOS PELO ICRP 103 (ICRP, 2007).....	- 9 -
TABELA 2.1 – DISTRIBUIÇÃO DOS DADORES DE ACORDO COM A FAIXA ETÁRIA.	- 15 -
TABELA 3.1 – VALORES TOTAIS DE ABERRAÇÕES CROMOSSÓMICAS INSTÁVEIS PARA CADA DADOR E PARA CADA DOSE, OBTIDOS APÓS A CONTABILIZAÇÃO DE 200 METAFASES.	- 24 -
TABELA 3.2 – VALORES DO ÍNDICE MITÓTICO PARA CADA DADOR E PARA CADA DOSE, OBTIDOS APÓS A OBSERVAÇÃO DE 1000 CÉLULAS.	- 25 -
TABELA 3.3 – FREQUÊNCIA DE DICÊNTRICOS E DICÊNTRICOS+ANÉIS EM FUNÇÃO DA DOSE, REFERENTES A CADA DADOR. O VALOR DE P REFERENTE AO TESTE DE HOMOGENEIDADE PARA CADA DOSE TAMBÉM SE ENCONTRA DESCRITO.....	- 26 -
TABELA 3.4 – <i>POOL</i> E DISTRIBUIÇÃO DE DICÊNTRICOS DOS 16 DADORES ESTUDADOS PARA A OBTENÇÃO DA CURVA DOSE-RESPOSTA PARA DICÊNTRICOS. A CURVA DOSE-RESPOSTA ENCONTRA-SE DESCRITA COM OS VALORES DO TESTE DE <i>GOODNESS-OF-FIT</i> . OS VALORES DE <i>U</i> E DO ÍNDICE DE DISPERSÃO TAMBÉM SÃO APRESENTADOS.	- 27 -
TABELA 3.5 – <i>POOL</i> E DISTRIBUIÇÃO DE DICÊNTRICOS+ANÉIS DOS 16 DADORES ESTUDADOS PARA A OBTENÇÃO DA CURVA DOSE-RESPOSTA PARA DICÊNTRICOS+ANÉIS. A CURVA DOSE-RESPOSTA ENCONTRA-SE DESCRITA COM OS VALORES DO TESTE DE <i>GOODNESS-OF-FIT</i> . OS VALORES DE <i>U</i> E DO ÍNDICE DE DISPERSÃO TAMBÉM SÃO APRESENTADOS.	- 27 -
TABELA 3.6 – ESTIMATIVA DAS DOSES PARA A VALIDAÇÃO DA CURVA DOSE-RESPOSTA DE DICÊNTRICOS.	- 29 -
TABELA 3.7 – ESTIMATIVA DAS DOSES PARA A VALIDAÇÃO DA CURVA DOSE-RESPOSTA DE DICÊNTRICOS+ANÉIS.....	- 29 -
TABELA 4.1 – VALORES DE COEFICIENTES α E β PARA DICÊNTRICOS E RESPECTIVOS PARÂMETROS DE <i>GOODNESS-OF-FIT</i> RETIRADOS DA LITERATURA. OS VALORES OBTIDOS NO PRESENTE TRABALHO TAMBÉM SE ENCONTRAM DESCRITOS.....	- 36 -

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC – Aberrações cromossômicas

ACE – Fragmento acêntrico

CABAS – Chromosome Aberration Calculation Software

CSB – Quebra de cromossoma

CSG – Lacuna de cromossoma

CTB – Quebra de cromátide

CTG – Lacuna de cromátide

DIC – Cromossoma dicêntrico

Dicêntrico – Cromossoma dicêntrico

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

F – Feminino

IAEA – Agência Internacional de Energia Atômica

ICRP – International Commission on Radiological Protection

KCl – Cloreto de potássio

LET – Transferência Linear de Energia

M – Masculino

RBE – Eficiência Biológica Relativa

RR – Rearranjo

SI – Sistema internacional

TA – Temperatura ambiente

TRI – Cromossoma tricêntrico

Tricêntrico – Cromossoma tricêntrico

UNSCEAR – United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation

1. INTRODUÇÃO

O uso generalizado de fontes de radiação ionizante em medicina, indústria, investigação, entre outras actividades, aumenta o risco de exposição accidental de pessoas. Cerca de 400 episódios de sobreexposição envolvendo doses elevadas de exposição aguda foram reportados pela Agência Internacional de Energia Atómica (IAEA) (Bolognesi *et al.*, 2011; González, 2007). De facto, de acordo com o United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation (UNSCEAR) 2008, o uso de radiação ionizante em aplicações médicas, como o diagnóstico e a radioterapia, tem sofrido um aumento significativo nas últimas décadas. Por último, a possibilidade de ocorrerem eventos radiológicos de grande dimensão, bem como ataques terroristas utilizando fontes de radiação ionizante tem-se vindo a tornar uma preocupação crescente (González, 2007; Wojcik *et al.*, 2010). Paralelamente ao uso generalizado da radiação, aumenta a possibilidade de sobreexposições accidentais e/ou intencionais, sendo necessárias ferramentas que permitam o estudo dos efeitos produzidos, quer seja num indivíduo ou na população.

1.1. RADIAÇÃO IONIZANTE

A radiação é um facto da vida. Vivemos num mundo em que a radiação está naturalmente presente. A luz e o calor provenientes de reacções nucleares no Sol são essenciais à vida, para além de que todos os organismos vivos estão continuamente expostos a radiação ionizante, como por exemplo, os raios cósmicos, os raios γ terrestres, a exposição ao radão e a ingestão de potássio-40 dos alimentos (Little, 2003). Adicionalmente, a exposição da população humana a radiação ionizante está a aumentar devido ao aumento das tecnologias nucleares e, fundamentalmente, devido ao uso generalizado de radiação ionizante em diagnóstico e terapia (IAEA, 2004; Toledo e Azzam, 2006; UNSCEAR, 2008).

As radiações podem ser classificadas de acordo com os efeitos que produzem na matéria. A radiação ionizante inclui os raios cósmicos, os raios x e a radiação proveniente de materiais radioactivos, e a radiação não-ionizante engloba, por exemplo, a luz ultravioleta, as ondas rádio ou as microondas (IAEA, 2004). A radiação ionizante pode definir-se como sendo qualquer onda ou partícula electromagnética que consegue ionizar, ou seja, que consegue remover um electrão de um átomo ou molécula (Little, 2003). Na sua maioria, os tipos de radiação são directamente ionizantes, isto é, com uma energia cinética adequada podem alterar a estrutura atómica do meio que atravessam, causando danos químicos e biológicos. Contudo, a radiação electromagnética, os raios x e γ , são indirectamente ionizantes, uma vez que por si só não produzem danos químicos ou biológicos, mas produzem electrões secundários quando absorvem energia do material que atravessam (IAEA, 2010).

1.1.1. TIPOS DE RADIAÇÃO IONIZANTE

São três, os principais tipos de radiação ionizante, as partículas α que incluem dois prótons e dois neutrões, as partículas β essencialmente constituídas por electrões e os raios γ e raios x que são energia pura (fotões). Os neutrões também podem ser tidos em conta e têm a mesma massa que os prótons, contudo não têm carga (URL 4).

As partículas α são emitidas por núcleos pesados instáveis e são semelhantes a um núcleo de hélio, com dois prótons e dois neutrões (IAEA, 2011). Estas partículas têm uma energia elevada e uma carga positiva de +2 devido aos dois prótons. Por serem partículas carregadas e com elevada massa têm uma velocidade reduzida e pouco poder de penetração e, consequentemente, uma elevada deposição de energia. Devido às suas características são facilmente absorvidas por uma folha de papel (Figura 1.1), sendo o seu alcance no ar de 1-2 cm (URL 4). Uma vez que têm pouco poder de penetração, as partículas α são perigosas essencialmente quando ingeridas ou inaladas. Como exemplo de radionuclídeos emissores de partículas α temos o amerício-241, polónio-210 e o radão-222.

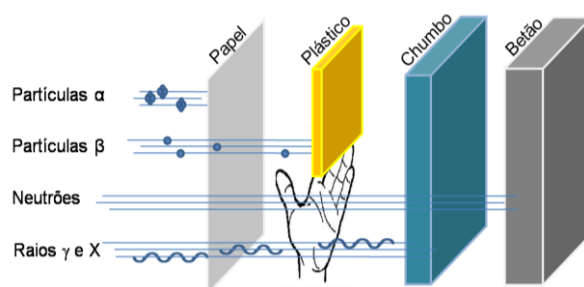


FIGURA 1.1 – ESQUEMA ILUSTRATIVO DO PODER DE PENETRAÇÃO DE DIFERENTES TIPOS DE RADIAÇÃO IONIZANTE (ADAPTADO DE IAEA, 2004).

As partículas β são partículas subatómicas semelhantes a electrões, com cerca de 1/2000 vezes a massa de um próton ou neutrão, ejectadas do núcleo de alguns átomos radioactivos, como por exemplo, o estrôncio-90, o cobalto-60 e o tecnécio-99. Estas partículas, porque são muito mais pequenas que as partículas α , têm maior poder de penetração e a sua velocidade varia consoante a sua energia, sendo geralmente absorvidas por plástico ou vidro, não penetrando para além da epiderme (Figura 1.1) (IAEA, 2004; URL 3). Assim como as partículas α , as partículas β são mais perigosas quando ingeridas ou inaladas, embora deva ter-se em conta que alguns emissores β , como o cobalto-60, emitem em simultâneo fotões (Toxicological Profile for Cobalt, 2004).

A radiação γ é radiação electromagnética de elevada energia. Os raios γ são geralmente emitidos por núcleos instáveis ao mesmo tempo que emitem radiação β , como é o caso do cobalto-60. Os fotões não têm carga nem massa, são energia pura e por isso propagam-se à velocidade da luz e, dependendo da sua energia, podem percorrer centenas de metros no ar até perderem toda a sua energia. Os raios x também são fotões de elevada energia, mas têm origem em campos eléctricos que rodeiam o núcleo ou são produzidos artificialmente (URL 5). Os fotões causam ionização nos

átomos, principalmente através de interacções com os electrões do material que atravessam e têm um elevado poder de penetração, sendo necessária a utilização de materiais de elevada densidade, como o chumbo (Figura 1.1), para uma blindagem eficaz. Os raios γ e x podem depositar doses elevadas em tecidos ou órgãos sem que para isso seja necessária a sua ingestão ou inalação (IAEA, 2004).

Os neutrões são emitidos por núcleos instáveis durante processos de fissão nuclear ou atómica (IAEA, 2004) e, uma vez que não têm carga, apenas participam em interacções electrostáticas quando são indirectamente ionizados. Os neutrões são o tipo de radiação que necessita de maior blindagem (Figura 1.1) porque, com a mesma massa e energia, têm maior capacidade de penetração que as partículas carregadas e, para além disso, quando interagem com a matéria provocam a emissão de radiação β e γ (IAEA, 2010; IAEA, 2004).

Os diversos tipos de partículas podem ser diferenciados segundo a densidade de energia depositada num material, designada por transferência linear de energia (LET). A LET é definida como a média da energia depositada por unidade de comprimento do trajecto percorrido pela radiação. Assim, a LET indica a característica dos diferentes tipos de radiação, sendo que as partículas carregadas têm geralmente alta LET uma vez que depositam a sua energia num menor espaço, enquanto a radiação γ e x têm baixa LET porque devido ao seu maior poder de penetração vão depositando a sua energia ao longo de um trajecto maior (IAEA, 2010).

1.1.2. FONTES DE RADIAÇÃO IONIZANTE

A radiação ionizante pode ser classificada como natural ou artificial (Tabela 1.1) de acordo com a forma como é produzida. As principais fontes de radiação natural são a radiação cósmica, os radionuclídeos encontrados em rochas e solos (UNSCEAR, 2008) e vários outros radionuclídeos presentes em produtos alimentares. As taxas de exposição devido aos radionuclídeos naturais variam de região para região. O radionuclídeo de origem natural mais importante é o gás radão, que é formado através do decaimento do urânio existente no solo (UNSCEAR, 2008). As fontes artificiais incluem os raios x utilizados em medicina, o *fallout* dos testes nucleares na atmosfera, os resíduos radioactivos e os raios γ provenientes da indústria (IAEA, 2004).

TABELA 1.1 – VALORES MÉDIOS DA DOSE EFECTIVA ANUAL NA POPULAÇÃO MUNDIAL PROVENIENTE DE FONTES DE RADIAÇÃO IONIZANTE DE ORIGEM NATURAL E ARTIFICIAL (ADAPTADO DE UNSCEAR 2008).

FONTE DE RADIAÇÃO		DOSE (mSv)	FONTE DE RADIAÇÃO		DOSE (mSv)
NATURAL	Externa		Médica	0,6	
	Cósmica	0,39	Ocupacional	0,005	
	Terrestre	0,48	Testes nucleares	0,005	
	Interna		Chernobyl	0,002	
	Ingestão	0,29	Centrais nucleares	0,0002	
	Radão (Inalação)	1,26			
	TOTAL = 3,0 mSv				

1.2. EFEITOS BIOLÓGICOS DA RADIAÇÃO IONIZANTE

Em geral, os efeitos da radiação ionizante podem ser designados por efeitos determinísticos e estocásticos. Os efeitos determinísticos ocorrem geralmente após uma exposição aguda a uma dose elevada ($>0,1$ Gy) que pode conduzir à morte ou perda de função de um órgão ou tecido, se um elevado número de células for afectado (ICRP, 2007; Little, 2003). Os efeitos produzidos caracterizam-se por uma dose-resposta não linear e por um limite abaixo do qual o efeito não é detectado (Edwards e Lloyd, 1998; ICRP, 2007; Little, 2003). Por seu lado, os efeitos estocásticos, designados como efeitos tardios da exposição a radiação ionizante, estão associados a exposições crónicas a baixas doses que podem provocar lesões genéticas que conduzem a doenças hereditárias, possíveis lesões no feto e desenvolvimento de cancro no indivíduo irradiado (Doll, 1998; URL 2). O aumento da exposição aumenta a probabilidade de ocorrência dos efeitos somáticos e hereditários, mas não a severidade das lesões (Little, 2003; URL 2).

1.2.1. LESÕES NO DNA INDUZIDAS PELA RADIAÇÃO IONIZANTE

As interações físicas da radiação ionizante com a matéria levam à perda de energia da radiação e à produção de átomos e moléculas ionizados ou excitados que se podem converter em radicais livres em 10^{-13} ou 10^{-15} s após a interacção (IAEA, 2010). A energia pode ser absorvida directamente pelo DNA, sendo a lesão causada no DNA designada como efeito directo. Este tipo de efeito é característico da radiação de alta LET como as partículas α e os neutrões (Han e Yu, 2010). Contudo, a absorção de energia depende da quantidade de material existente no trajecto percorrido pela radiação, assim, sendo a água a molécula predominante em organismos vivos, a maior parte da radiação vai ser depositada nestas moléculas, havendo formação de espécies reactivas de oxigénio (IAEA, 2010). As espécies reactivas de oxigénio podem interagir com o DNA danificando-o, sendo este efeito designado por efeito indirecto. No caso da radiação de baixa LET, os mecanismos que envolvem a formação de radicais livres excedem os efeitos directos da radiação no DNA (Han e Yu, 2010).

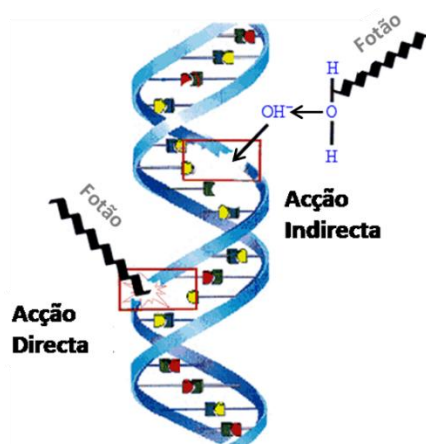


FIGURA 1.2 – MECANISMOS DE ACÇÃO DIRECTA E INDIRECTA NO DNA CAUSADA PELA RADIAÇÃO IONIZANTE (ADAPTADO DE URL 1).

Estudos de radiobiologia mostram que o DNA é o principal alvo dos efeitos biológicos da radiação, sendo que as principais lesões incluem alterações nas bases, quebras de cadeia simples e de cadeia dupla. Após uma dose de 1 Gy, verificam-se cerca de 1000 lesões nas bases, cerca de 1000 quebras de cadeia simples e cerca de 40 quebras de cadeia dupla (von Sonntag, 2007). É actualmente aceite que a formação de quebras de cadeia dupla é a lesão mais crítica causada pela exposição a radiação e que leva à formação de aberrações cromossómicas (Rodrigues *et al.*, 2005).

1.2.2. AVALIAÇÃO DA LESÃO GENÉTICA

Os agentes genotóxicos induzem diferentes tipos de lesões no DNA que podem ou não ser reparadas. As lesões não reparadas conduzem a efeitos biológicos, como a morte celular, a indução de aberrações cromossómicas e mutações, entre outros (Natarajan e Palitti, 2008). As aberrações cromossómicas são uma importante consequência biológica da exposição celular a agentes genotóxicos (Obe *et al.*, 2002) e consistem em alterações no número e estrutura dos cromossomas, visíveis ao microscópio, pela observação de células em metafase (Dean e Danford, 1984). Este tipo de aberrações pode ser classificado como instável ou estável, de acordo com a sua capacidade de persistência em populações celulares em divisão (Lloyd, 1997). As aberrações instáveis englobam cromossomas dicêntricos, anéis, fragmentos acêntricos e outros rearranjos assimétricos provocados por trocas. As aberrações estáveis englobam translocações, inversões e outros rearranjos simétricos (IAEA, 2011). As aberrações cromossómicas podem também ser designadas como estruturais ou numéricas, sendo que estas últimas se referem a alterações no número de cromossomas. Estas alterações podem ocorrer devido a falhas durante a divisão celular, sendo que a aneuploidia diz respeito ao aumento ou diminuição do número de cromossomas, enquanto a poliploidia envolve um conjunto de cromossomas, onde estão incluídas as endorreplicações (Klaassen, 1996). As anomalias cromossómicas estruturais podem ser aberrações cromatídicas quando ocorrem apenas numa cromátide, ou aberrações cromossómicas quando ocorrem na mesma localização em ambas as cromátides do cromossoma. As aberrações cromatídicas estão geralmente relacionadas com exposição a agentes químicos, enquanto as aberrações cromossómicas são mais específicas de exposição a radiação ionizante (Bonassi e Au, 2002; de Lemos Pinto *et al.*, 2010). Na Figura 1.3 estão exemplificados os principais tipos de aberrações cromossómicas.



FIGURA 1.3 – REPRESENTAÇÃO DOS PRINCIPAIS TIPOS DE ABERRAÇÕES CROMOSSÓMICAS (ADAPTADO DE SAVAGE, 1999).

O cromossoma dicêntrico é a aberração cromossômica característica da exposição a radiação ionizante. Este forma-se quando dois cromossomas que sofreram uma lesão se juntam, sendo acompanhado de um ou dois fragmentos acêntricos que são compostos pelas peças acêntricas dos cromossomas que formaram o cromossoma dicêntrico (Figura 1.4). O cromossoma dicêntrico forma-se através da quebra de dois cromossomas, podendo a quebra ocorrer nos dois cromossomas através da mesma ionização ou através de duas ionizações distintas. A técnica das aberrações cromossômicas consiste na análise de células em metafase, obtidas através da utilização de um inibidor do fuso mitótico, a colcemida (IAEA, 2011). A análise do tipo de aberração induzida é muito importante e os critérios seguidos para a identificação dos diferentes tipos de aberrações cromossômicas são descritos extensivamente por Dean e Danford (1984) e Rueff *et al.* (1993).

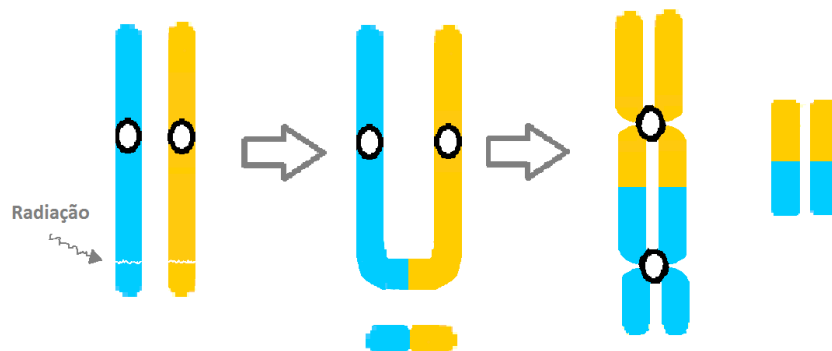


FIGURA 1.4 – ESQUEMA REPRESENTATIVO DA FORMAÇÃO DE UM CROMOSSOMA DICÊNTRICO.

1.3. DOSIMETRIA

A radiação pode ser medida em termos de dose de exposição ou de dose absorvida. A dose absorvida é definida como a quantidade de energia absorvida por unidade de massa. A unidade é J/Kg, a que se deu a designação especial de Gray (Gy) (Oliveira e Pedroso de Lima, 2008; IAEA, 2010). No campo da protecção radiológica é utilizado o equivalente de dose que compara a eficiência biológica relativa (RBE) dos diferentes tipos de radiação no tecido. O equivalente de dose (H_T) é descrito pela Equação 1.1 em que a dose absorvida (D_T) é multiplicada pelo factor de ponderação da radiação (W_R) descritos na Tabela 1.2. A unidade do SI para o equivalente de dose é o Sv (J/Kg) e no caso da radiação de baixa LET 1 Sv será igual a 1 Gy uma vez que o factor de ponderação para este tipo de radiação é 1 (ICRP, 2007; IAEA, 2010). A dose efectiva (E) é descrita pela Equação 1.2. em que o equivalente de dose (H_T) é multiplicada pelo factor de ponderação do tecido (W_T) descritos na Tabela 1.3. Assim como para o equivalente de dose, a grandeza da dose efectiva é o Sv.

$$H_T = \sum W_R \times D_T \quad \text{EQUAÇÃO 1.1}$$

$$E = \sum W_T \times H_T \quad \text{EQUAÇÃO 1.2}$$

TABELA 1.2 – FACTOR DE PONDERAÇÃO PARA OS DIFERENTES TIPOS DE RADIAÇÃO (ADAPTADO DE ICRP, 2007).

TIPO DE RADIAÇÃO	FACTOR PONDERAÇÃO (W_R)
Fotões	1
Electrões	1
Protões	2
Partículas α , iões pesados e fragmentos de fissão	20
Neutrões	2,5 – 20 (dependendo da energia dos neutrões)

TABELA 1.3 – FACTOR DE PONDERAÇÃO PARA OS DIFERENTES TECIDOS (ADAPTADO DE ICRP, 2007).

TECIDO	FACTOR PONDERAÇÃO (W_T)
Medula óssea, Cólon, Pulmão, Estômago, Mama	0,12
Gónadas	0,08
Bexiga, Fígado, Esófago, Tiróide	0,04
Pele, Cérebro, Glândulas salivares	0,01

1.3.1. PROTECÇÃO RADIOLÓGICA

O sistema de Protecção Radiológica baseia-se no pressuposto de que todos estão expostos a radiação ionizante seja ela natural ou resultante de acção humana. Contudo, segundo recomendação da International Commission on Radiological Protection (ICRP), distinguem-se 3 categorias de exposição: exposição ocupacional (trabalhadores expostos), médica (pacientes) e do público em geral, sendo que os limites de dose recomendados variam consoante a categoria de exposição (Tabela 1.4) (ICRP, 2007).

TABELA 1.4 – LIMITES DE DOSE RECOMENDADOS PELO ICRP 103 (ICRP, 2007).

	LIMITE DE DOSE	
	EXPOSIÇÃO OCUPACIONAL	EXPOSIÇÃO DO PÚBLICO
Dose Efectiva	20 mSv/ano	1 mSv/ano
Equivalente Dose / ano		
Olho	150 mSv	15 mSv
Pele	500 mSv	50 mSv
Extremidades (mãos e pés)	500 mSv	-

No caso da exposição ocupacional, a recomendação é de que os 20 mSv/ano sejam uma média de 5 anos, ou seja, em 5 anos não devem ser excedidos os 100 mSv. Contudo, num só ano não devem ser excedidos os 50 mSv. No caso da exposição médica, não é aplicado um limite de dose, mas sim uma

restrição de dose e deve ter-se em conta a justificação e a optimização da prática, de modo a que o paciente esteja exposto à menor dose possível (ICRP, 2007).

1.3.2. DOSIMETRIA BIOLÓGICA

A dosimetria biológica é um método de quantificação da dose absorvida de um indivíduo em situações de exposição ocupacional ou accidental a radiação ionizante. A dosimetria biológica, aplicada à protecção radiológica, é um método importante e independente que suplementa a dosimetria física e tem um papel vital no diagnóstico e no tratamento clínico de indivíduos que tenham sido irradiados (Hadjidekova *et al.*, 2010; Monteiro Gil *et al.*, 2000). Na investigação de emergências radiológicas é importante estimar a dose dos indivíduos expostos por diversas razões. No caso de exposições com valores de dose superiores a 1 Gy, a informação acerca da dose serve para determinar a terapia que deverá ser aplicada e também para alertar os médicos da possibilidade de ocorrerem efeitos determinísticos após algumas semanas ou meses. Para exposições abaixo de 1 Gy é necessário informar o médico acerca dos dados dosimétricos, uma vez que é necessário que o médico aconselhe os indivíduos acerca da possibilidade de ocorrerem efeitos estocásticos, como por exemplo, o aparecimento de cancro (IAEA, 2011). Nas primeiras semanas após uma exposição accidental, a estimativa da dose é normalmente feita através da combinação da dosimetria física e biológica contudo, quando a estimativa da dose por métodos físicos não é possível, a dosimetria biológica é a única alternativa para quantificar a dose (Ainsbury *et al.*, 2011; Léonard *et al.*, 2005; Lloyd, 1997; Rodrigues *et al.*, 2005; Roy *et al.*, 2004). A dosimetria biológica tem também um papel relevante no período imediatamente após uma exposição accidental ou ataque terrorista, onde tenha ocorrido a exposição de um elevado número de pessoas, uma vez que a triagem, utilizando *endpoints* clínicos e biológicos, permite uma rápida identificação dos indivíduos que de facto foram expostos, possibilitando tratamento médico adequado num curto espaço de tempo (IAEA, 2011). A dose biológica é estimada a partir da comparação do número de aberrações cromossómicas instáveis (cromossomas dicêntricos e anéis), em linfócitos do sangue periférico do indivíduo em estudo, com uma curva de calibração obtida *in vitro* (Hadjidekova *et al.*, 2010; Iwasaki *et al.*, 2011; Léonard *et al.*, 1988; Martins *et al.*, 2013; Ramalho e Nascimento, 1991; Rodrigues *et al.*, 2005). Os linfócitos são utilizados por ser conhecida a sua elevada radiosensibilidade e também dada à sua facilidade de obtenção, uma vez que apenas é necessária a colheita de uma amostra de sangue periférico (de Lemos Pinto *et al.*, 2010; Lloyd e Purrott, 1981; Rodrigues *et al.*, 2005). Contudo, como as aberrações cromossómicas são contabilizadas em metafase e a maioria dos linfócitos estão em fase G₀, estes têm que ser estimulados a dividirem-se e para tal é usada a fitohemaglutinina (IAEA, 2001; Madhvanath, 1976; Nowel, 1960).

Os cromossomas dicêntricos são aberrações cromossómicas instáveis altamente específicas da radiação ionizante, mostrando uma relação dose-efeito linear-quadrática para doses até 5 Gy, no caso de exposições agudas. Para além da elevada especificidade, o nível basal na população em geral é muito baixo, cerca de 1 dicêntrico por cada 1000 células analisadas, permitindo desta forma que o seu limite inferior de detecção seja de cerca de 0,1 Gy para radiação de baixa LET, quando são

contabilizadas 500-1000 metafases (Ainsbury *et al.*, 2011; de Lemos Pinto *et al.*, 2010; IAEA, 2011; Romm *et al.*, 2011). Todas estas características tornam o ensaio dos cromossomas dicêntricos o “gold standard” para o conhecimento da dose em casos de exposições inesperadas (Blakely *et al.*, 2005). Contudo, para a análise dos cromossomas dicêntricos, as amostras de sangue periférico devem ser recolhidas até quatro semanas após a exposição, uma vez que a partir desse tempo a frequência de cromossomas dicêntricos começa a diminuir (IAEA, 2001).

Segundo as recomendações da IAEA (2001), cada laboratório deve ter a sua curva dose-resposta, uma vez que são diversos os factores que podem influenciar a relação dose-efeito, tais como, o débito de dose usado nas irradiações *in vitro*, as condições de cultura ou os critérios de leitura (Barquinero *et al.*, 1995; Beinke *et al.*, 2010; Hadjidekova *et al.*, 2010; Köksal *et al.*, 1995; Lloyd *et al.*, 1975; Romm *et al.*, 2009; Roy *et al.*, 2004; Senthamizhchelvan *et al.*, 2007). Diferentes estudos realizados, usando radiação de alta e baixa LET, demonstraram que exposições *in vitro* e *in vivo* resultam numa frequência de cromossomas dicêntricos muito similar (Romm *et al.*, 2009; Schmid *et al.*, 1974). Desta forma, e apesar de alguma variabilidade de resposta à exposição a radiação ionizante ter sido reportada, a maioria dos laboratórios consegue estimar doses, com um elevado grau de fiabilidade, próximas dos valores reais (Barquinero *et al.*, 1995).

As curvas dose-resposta adquirem diferentes formas em função da LET e do RBE (de Lemos Pinto *et al.*, 2010). Para radiação de baixa LET, raios x e γ , a curva dose-resposta para cromossomas dicêntricos é melhor descrita pelo modelo linear quadrático: $Y = c + \alpha D + \beta D^2$, em que Y é o número de cromossomas dicêntricos, c é o nível basal de cromossomas dicêntricos, α é o coeficiente das aberrações produzidas por uma ionização, β é o coeficiente das aberrações produzidas como consequência de duas ionizações e D é a dose. O quociente α/β corresponde à dose em que os componentes linear e quadrático contribuem de igual forma na formação de aberrações, sendo que abaixo desta dose as aberrações são na sua maioria produzidas por uma única ionização. O valor de c, que representa o *background* de cromossomas dicêntricos em pessoas não expostas, é relativamente baixo e, geralmente, considera-se que está no intervalo 0,0005-0,0010 (Szłuińska *et al.*, 2007). Por outro lado, para radiação de alta LET, neutrões e partículas α , a curva dose-resposta é melhor descrita pelo modelo linear: $Y = c + \alpha D$ (de Lemos Pinto *et al.*, 2010; IAEA, 2001). Esta diferença na forma das curvas para radiação de alta e baixa LET está relacionada com a quantidade de energia depositada por cada ionização, levando a que o RBE seja diferente para os diferentes tipos de radiação (IAEA, 2001).

Por fim, a estimativa da dose requer a construção de uma curva de calibração pelo método *maximum likelihood* (Papworth, 1975) que não se encontra disponível nos *softwares* estatísticos *standard*. Contudo, dois *softwares*, o *Chromosome Aberration Calculation Software* (CABAS) (Deperas *et al.*, 2007) e o Dose Estimate (Ainsbury e Lloyd, 2010), têm vindo a ser desenvolvidos e permitem a construção de curvas de calibração, estimativa de doses e o cálculo de intervalos de confiança, quer seja no caso de exposições parciais ou de corpo inteiro.

Por tudo isto, a dosimetria biológica tem um papel fundamental na estimativa de doses em caso de acidentes/incidentes, sendo por vezes a única forma de quantificar a dose. Paralelamente, têm sido criadas redes internacionais com vista a aumentar a capacidade de resposta no caso de acidentes/incidentes que envolvam um elevado número de pessoas. Neste contexto, uma curva dose-resposta *in vitro* foi implementada na IST/ITN, sendo a primeira vez que este estudo é realizado em Portugal.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. POPULAÇÃO

Para a realização da curva dose-resposta usamos uma amostra constituída por 16 dadores de nacionalidade Portuguesa. Foram seleccionados 16 indivíduos saudáveis, não fumadores e não expostos a radiação ionizante nos seis meses anteriores à colheita de sangue. Os dadores foram uniformemente distribuídos em quatro faixas etárias, dos 20 aos 59 anos, sendo cada faixa etária constituída por quatro dadores, dois do sexo masculino e dois do sexo feminino. Na Tabela 2.1 encontram-se distribuídos os dadores pelas quatro faixas etárias.

TABELA 2.1 – DISTRIBUIÇÃO DOS DADORES DE ACORDO COM A FAIXA ETÁRIA.

FAIXA ETÁRIA	CÓDIGO DO DADOR	IDADE	SEXO
20 – 29 anos	D2	23	F
	D4	20	M
	D7	28	F
	D8	27	M
30 – 39 anos	D3	30	F
	D5	35	F
	D6	39	M
	D11	37	M
40 – 49 anos	D1	49	M
	D9	48	F
	D10	42	M
	D15	46	F
50 – 59 anos	D12	54	F
	D13	58	M
	D14	52	M
	D16	53	F

Foi elaborado um questionário, que foi respondido por todos os dadores, para ficarem registadas informações demográficas e clínicas, hábitos alimentares e tabágicos, para trabalho futuro. A esse questionário estava acoplada uma informação acerca do objectivo do estudo, pelo que todos os dadores deram o seu consentimento informado para a participação neste estudo.

2.1.1. COLHEITA DAS AMOSTRAS DE SANGUE PERIFÉRICO

A cada dador foi retirada, por punção venosa, uma amostra de 15-20 mL de sangue periférico. Após a colheita, o sangue foi transferido, cuidadosamente para evitar a hemólise, para dois tubos estéreis de 13 mL contendo 50 µL de heparina sódica (5000 U.I./mL) para prevenir a coagulação. Até ao início da cultura o sangue permaneceu à temperatura ambiente (TA). De referir que em cada experiência realizada foram sempre estudados dois dadores.

2.2. IRRADIAÇÃO *IN VITRO*

As amostras de sangue periférico foram irradiadas *in vitro* com uma fonte de cobalto-60 proveniente de um irradiador AECL ELDORADO 6 instalado no Laboratório de Metrologia das Radiações Ionizantes da IST/ITN. Para a elaboração da curva de calibração estudamos a resposta dos 16 dadores a seis doses diferentes: 0,25; 0,50; 0,75; 1,0; 2,0 e 3,0 Gy. Foi sempre realizado, para cada dador, um controlo não irradiado (0 Gy).

Para a irradiação foi distribuído 1,8 mL de sangue dos dadores por tubos de vidro de 4 mL e as amostras foram irradiadas segundo o esquema da Figura 2.1. Para cada dose o sangue dos dois dadores foi sempre irradiado em simultâneo, à TA, a 80 cm da fonte e num campo de radiação de 8 cm × 8 cm. Devido ao decaimento da fonte de cobalto-60, a taxa de dose, no decorrer das diferentes experiências, variou de 180 a 133 mGy/min.

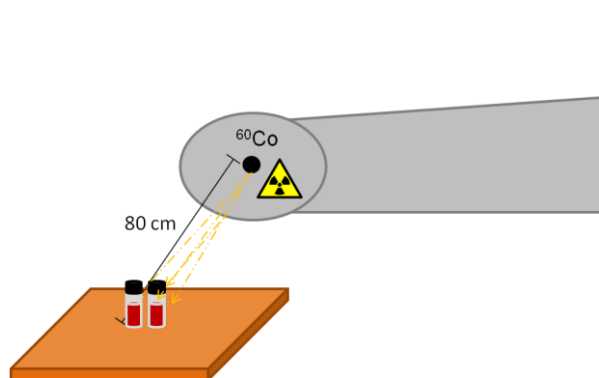


FIGURA 2.1 – ESQUEMA REPRESENTATIVO DO PROCESSO DE IRRADIAÇÃO.

2.3. TÉCNICA DAS ABERRAÇÕES CROMOSSÓMICAS

Após a irradiação das amostras de sangue procedeu-se à cultura das mesmas para a realização da técnica das aberrações cromossómicas. Para todos os dadores e para todas doses as culturas foram sempre feitas em triplicado.

Para a cultura, colocou-se 4,5 mL de meio de RPMI-1640 com L-Glutamina suplementado com 25% de soro de bovino fetal, 1,5% de antibióticos (penicilina (10000 U) e estreptomicina 10 mg/mL) e 0,5% de heparina sódica (5000 U.I./mL) (Anexo I) em tubos estéreis de 13 mL. De seguida foram adicionadas aliquotas de 500 µL de sangue e 2,5% de fitohemaglutinina (Anexo I). A fitohemaglutinina foi adicionada para estimular o ciclo celular nos linfócitos, uma vez que estes se encontram, na sua maioria, na fase G₀. Os tubos foram incubados a 37 °C, inclinados a 45° numa estufa com 5% CO₂, durante 48 h. Às 47 h de cultura foi adicionada colcemida (0,11 µg/mL) que inibe a formação do fuso acromático, aumentando desta forma o número de células em metafase. Ao fim das 48 h interrompeu-se a cultura centrifugando-se os tubos a 1500 rpm, durante 5 min à TA. De seguida, retirou-se o sobrenadante por decantação, ressuspendeu-se o botão celular suavemente no agitador

e adicionou-se 10 mL de uma solução de KCl 0,56% (p/v) (Anexo I), previamente aquecida a 37 °C. Depois de se homogeneizar a suspensão por inversão, os tubos foram colocados em banho-maria a 37 °C, durante 20 min, para promover o choque hipotónico. Após os 20 min, os tubos foram imediatamente centrifugados conforme descrito anteriormente. Removeu-se o sobrenadante, novamente por decantação e ressuspenso o botão celular suavemente no agitador. As células foram então fixadas, sob agitação, com 5 mL de mistura fixadora de metanol: ácido acético (3:1 (v/v)) (Anexo I), previamente arrefecida a -20 °C. Depois de se homogeneizar a suspensão, por inversão, centrifugou-se como descrito. O processo de fixação e posterior centrifugação foi repetido duas vezes. Por fim, depois de se homogeneizar o botão celular, adicionou-se 10 mL de mistura fixadora e homogeneizou-se novamente. Nesta fase, os tubos podem ser guardados a -20 °C durante um longo período de tempo.

Para preparar as lâminas, os tubos que se encontravam guardados a -20 °C, foram centrifugados a 1500 rpm, durante 5 min à TA. As lâminas foram previamente lavadas, submersas em água destilada e colocadas a 4 °C. O sobrenadante foi retirado, tendo o cuidado de deixar cerca de 500 µL de mistura fixadora. Nos casos em que a densidade celular era mais elevada, adicionou-se mais mistura fixadora de modo a diluir um pouco a amostra. Depois de se homogeneizar muito bem a suspensão, espalhou-se, com o auxílio de uma pipeta de Pasteur de vidro, cerca de três gotas por lâmina, de uma altura de cerca de 15 cm. Na preparação das lâminas, a altura utilizada é fundamental, deve ser suficiente para que as metáfases fiquem bem definidas, mas tendo sempre em conta que os cromossomas também não devem ficar demasiado dispersos. Este processo repetiu-se até não restar suspensão no tubo. Depois de bem secas, pelo menos 24 h, procedeu-se à coloração das lâminas com uma solução de Giemsa 4% em tampão fosfato pH 6,8 (v/v) (Anexo I). As lâminas estiveram submersas nessa solução durante 10 min e de seguida foi retirado o excesso de corante com água corrente. Deixaram-se secar as lâminas ao ar e na vertical. Depois de bem secas, as lâminas foram seladas, colocando sobre as mesmas, lamelas de 24 × 50 mm e meio de montagem Entellan®. Depois de seladas, as lâminas foram observadas no microscópio óptico.

2.3.1. CRITÉRIOS DE LEITURA

No presente trabalho foram contabilizadas 200 metáfases completas, lidas por dois operadores distintos, sendo que cada um dos operadores leu 100 metáfases. No total dos 16 dadores, para cada dose estudada foram contabilizadas 3200 metáfases, com a excepção da dose de 0,75 Gy onde foram contabilizadas apenas 3195 metáfases. Assim, no total dos controlos e das 6 doses estudadas foram contabilizadas 22395 metáfases completas. Para a visualização das metáfases na lâmina foi utilizada a objectiva de ampliação de 10x e para a análise das mesmas foi utilizada a objectiva de ampliação de 100x.

A identificação e classificação das aberrações cromossómicas foi feita segundo os critérios definidos pela IAEA (2001), apenas foram contabilizadas metáfases completas, isto é, com 46 centrómeros. No caso da metáfase ter aberrações o número de peças deve ser balanceado, por exemplo, se uma

metáfase apresentar um cromossoma dicêntrico, para ser contabilizada tem que ter, pelo menos, um fragmento acêntrico para perfazer 46 peças e assim ser contabilizada. No entanto, no caso de ser um anel, este tem que ser também acompanhado por um fragmento acêntrico, tendo a metáfase, neste caso, 47 peças. Os fragmentos, quando não estavam associados a cromossomas dicêntricos ou anéis, foram contabilizados como fragmentos acêntricos em excesso. Em relação aos cromossomas tricêntricos, foram contabilizados apenas quando estavam presentes pelo menos dois fragmentos acêntricos e foram considerados como dois cromossomas dicêntricos. Todos os rearranjos foram registados. Considerou-se a ocorrência de uma quebra de cromátide ou cromossoma quando a distância da interrupção era superior à largura da cromátide e/ou quando o fragmento se encontrava desalinhado relativamente à cromátide/cromossoma. Nos casos em que estas interrupções eram inferiores à largura da cromátide e se encontravam alinhadas com a cromátide/cromossoma foram registadas como lacunas. De referir que as lacunas foram registadas mas não foram tidas em conta na análise dos resultados, porque estas podem ser facilmente confundidas com falhas na coloração dos cromossomas. Todas as aberrações encontradas foram confirmadas por um terceiro operador. Adicionalmente foi contabilizado o índice mitótico, que corresponde ao número de metafases encontradas em 1000 células.

2.4. CONSTRUÇÃO DA CURVA DOSE-RESPOSTA

O primeiro passo para a construção das curvas dose-resposta foi aplicar a todas as doses o *Chi Squared Homogeneity Test* do *software* Dose Estimate, v. 4.1 (Ainsbury e Lloyd, 2010), a fim de verificar a homogeneidade entre dadores, para os dois *endpoints* escolhidos, dicêntricos e dicêntricos+anéis. Estes *endpoints* foram escolhidos por serem aberrações específicas da exposição a radiação ionizante. As curvas dose-resposta para dicêntricos e dicêntricos+anéis foram construídas utilizando o *software* CABAS (v. 2) (Deperas *et al.*, 2007) e o *software* Dose Estimate. Os testes de *goodness-of-fit* das curvas foram realizados utilizando o *software* Dose Estimate. De seguida, calcularam-se os intervalos de confiança de 95%, superior (Y_S) e inferior (Y_I), assumindo uma distribuição de Poisson, de acordo com o método simplificado de Merkle, como descrito em IAEA (2011) e em Szłuińska *et al.* (2007). Segundo este método, quando o número de dicêntricos e dicêntricos+anéis (Y) é inferior ou igual a 100, os valores de Y_S e Y_I são obtidos através de tabelas estatísticas de intervalos de confiança de 95% para distribuições de Poisson. O limite inferior e superior dos intervalos de confiança de 95% são calculados dividindo o valor de Y_S e Y_I retirados das tabelas estatísticas, pelo número de metafases analisadas. Por outro lado, quando o número de dicêntricos/dicêntricos+anéis (Y) é superior a 100, os valores de Y_S e Y_I são obtidos pelas Equações 2.1 e 2.2 (URL 6).

$$Y_S = \frac{Y + (1,96 \sqrt{Y})}{\text{n.}^\circ \text{ metafases}} \quad \text{EQUAÇÃO 2.1}$$

$$Y_I = \frac{Y - (1,96 \sqrt{Y})}{\text{n.}^\circ \text{ metafases}} \quad \text{EQUAÇÃO 2.2}$$

Para determinar se os dicêntricos e dicêntricos+anéis seguiam uma distribuição de Poisson, calculou-se o índice de dispersão e a sua unidade normalizada (u) (Edwards *et al.*, 1979). O índice de dispersão (σ^2/Y) corresponde à divisão entre a variância do número de dicêntricos ou dicêntricos+anéis (σ^2) pelo número de dicêntricos/dicêntricos+anéis (Y). Para o cálculo do u utilizou-se a Equação 2.3, em que N é o n.º de metafases analisadas, Y é o número de dicêntricos (ou dicêntricos+anéis) e σ^2 é a variância de Y .

$$u = \frac{\frac{(N-1)\sigma^2}{Y} - (N-1)}{\sqrt{2(N-1)\left(1 - \frac{1}{NY}\right)}} \quad \text{EQUAÇÃO 2.3}$$

Nos casos em que os valores de u apresentaram valores superiores a $\pm 1,96$ os intervalos de confiança de 95% foram corrigidos de acordo com as recomendações da IAEA (2011), aplicando as Equações 2.4 e 2.5, para o ajuste do Y_S e Y_I , respectivamente.

$$Y_{S \text{ ajustado}} = Y_S \times \left(\frac{Y + (1,96 \sqrt{Y})}{Y} \right)^{\sqrt{\sigma^2/Y}} \quad \text{EQUAÇÃO 2.4}$$

$$Y_{I \text{ ajustado}} = Y_I \times \left(\frac{Y - (1,96 \sqrt{Y})}{Y} \right)^{\sqrt{\sigma^2/Y}} \quad \text{EQUAÇÃO 2.5}$$

2.4.1. VALIDAÇÃO DA CURVA DOSE-RESPOSTA

Para a validação da curva, realizamos uma experiência com três dadores que foram irradiados *in vitro*, como descrito em 2.2, em que a dose a que estiveram sujeitos era desconhecida para os operadores (1,75 Gy). Dos três dadores estudados, um era do sexo feminino e tinha 31 anos (DR A) e dois eram do sexo masculino e tinham 42 e 48 anos, sendo designados por DR B e DR C, respectivamente. De referir que o DR B era um trabalhador ocupacionalmente exposto a radiação ionizante. Os três dadores assinaram o consentimento informado para a participação neste estudo e responderam igualmente ao questionário mencionado em 2.1. A técnica das aberrações cromossômicas foi realizada como descrito em 2.3. Os critérios de leitura foram os descritos em 2.3.1, sendo que para o dador A e B foram contabilizadas 400 metafases e para o dador C foram contabilizadas apenas 200 metafases. As doses foram estimadas a partir da Equação 2.6, em que α , β e c são os parâmetros das curvas dose-resposta construídas e Y o número de dicêntricos/dicêntricos+anéis contabilizados para cada um dos dadores.

$$D = \frac{-\alpha + \left(\alpha^2 - 4\beta(c - Y)^{1/2} \right)}{2\beta} \quad \text{EQUAÇÃO 2.6}$$

2.5. COMPARAÇÃO ENTRE DADORES

Paralelamente à construção e validação das curvas dose-resposta, dividiram-se os dadores em dois grupos, sexo masculino e feminino, e também em duas faixas etárias, dos 20-39 anos e dos 40-59 anos, para estudar possíveis diferenças na resposta à radiação ionizante. Cada um dos grupos era constituído por oito dadores, sendo que para a comparação se fez a média entre os dadores. O desvio padrão associado foi também calculado.

3.RESULTADOS

No total dos 16 dadores estudados foram analisadas 22395 metafases (Figura 3.1), em que foram contabilizados 2509 dicêntricos, 25 tricêntricos e 243 anéis, que foram tidos em conta para a construção das curvas dose-resposta. Uma vez que um tricêntrico foi considerado como dois dicêntricos (IAEA, 2011; Edwards *et al.*, 1979), para a construção das curvas dose-resposta foi tido em conta um total de 2802 aberrações cromossômicas instáveis, perfazendo os anéis um total de 8,7% dos rearranjos.

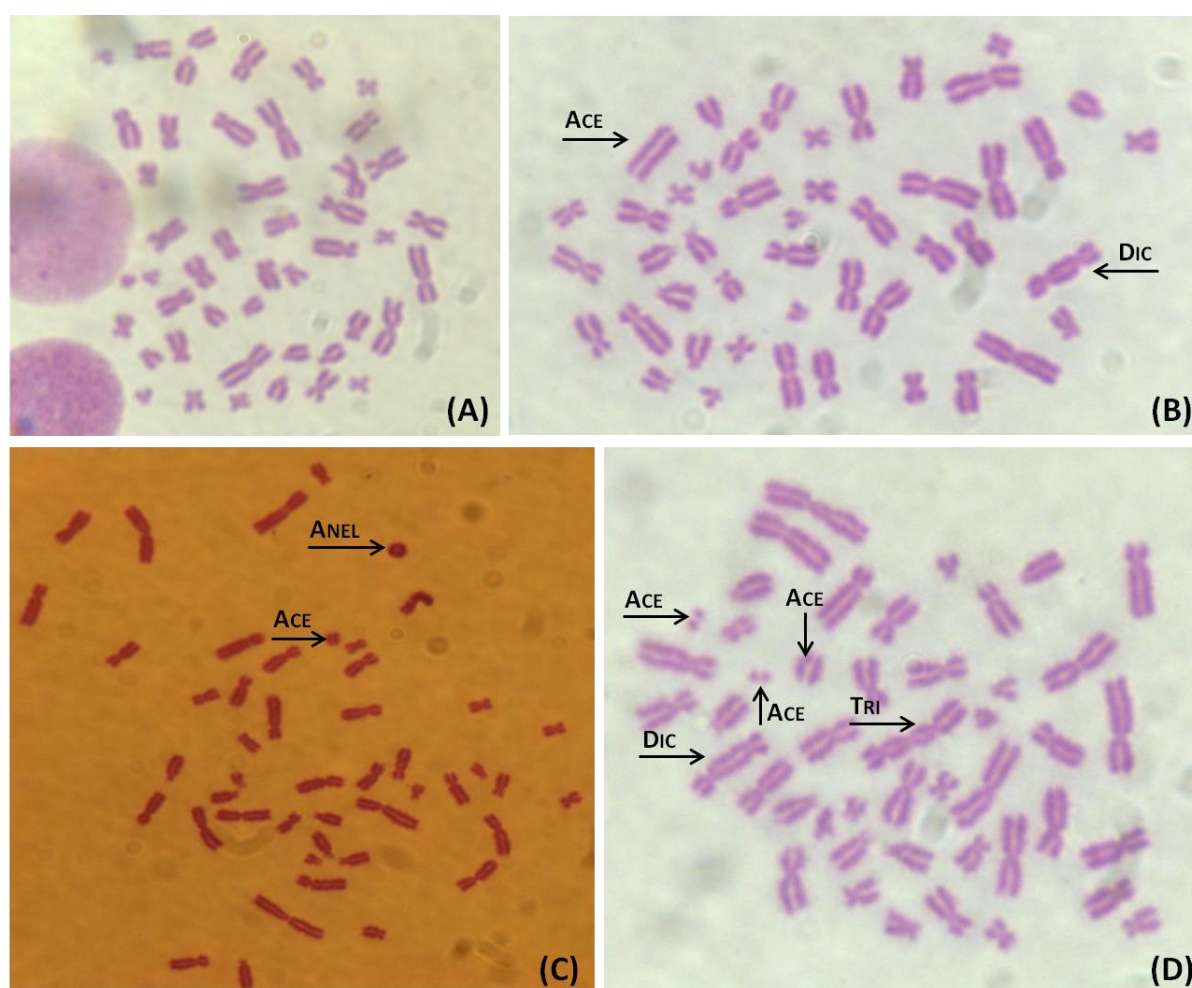


FIGURA 3.1 – IMAGENS DE METAFASES OBTIDAS E CONTABILIZADAS NO DECORRER DESTE TRABALHO.

ACE – FRAGMENTO ACÊNTRICO; DIC – DICÊNTRICO; TRI – TRICÊNTRICO; (A) METAFASE NORMAL – 46 CROMOSSOMAS; (B) METAFASE COM 1 DICÊNTRICO E 1 FRAGMENTO ACÊNTRICO – 46 CENTRÔMEROS; (C) METAFASE COM 1 ANEL E 1 FRAGMENTO ACÊNTRICO – 46 CENTRÔMEROS; (D) METAFASE COM 1 TRICÊNTRICO, 1 DICÊNTRICO E 3 FRAGMENTOS ACÊNTRICOS – 46 CENTRÔMEROS.

Adicionalmente, também foram registados outros tipos de aberrações cromossômicas instáveis, lacunas e quebras de cromátide e cromossoma, fragmentos acêntricos e rearranjos (tri- e tetra- radiais). Na Tabela 3.1 encontram-se registadas todas as aberrações encontradas em cada um dos dadores para cada uma das doses estudadas.

RESULTADOS

TABELA 3.1 – VALORES TOTAIS DE ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS INSTÁVEIS PARA CADA DADOR E PARA CADA DOSE, OBTIDOS APÓS A CONTABILIZAÇÃO DE 200 METAFASES.

DADOR	DOSE	CTG	CSG	CTB	CSB	ACE	DIC	ANEL	RR
D1	0,00	1	0	2	0	0	0	0	0
	0,25	1	0	0	0	5	1	0	0
	0,50	2	0	5	0	10	1	0	0
	0,75	0	0	2	0	14	7	0	0
	1,00	1	0	2	0	21	5	0	1
	2,00	2	1	0	0	86	50	5	0
	3,00	1	1	0	0	125	56	10	0
D3	0,00	1	0	2	0	2	0	0	0
	0,25	1	0	1	1	4	1	0	0
	0,50	2	0	7	0	18	8	0	0
	0,75	2	0	12	2	20	5	1	0
	1,00	2	0	6	1	26	13	0	0
	2,00	1	0	8	1	103	44	3	1
	3,00	1	1	9	2	242	135	5	0
D5	0,00	1	0	4	0	4	0	0	0
	0,25	0	0	5	2	3	1	0	0
	0,50	2	0	6	0	6	0	0	0
	0,75	2	0	2	0	15	3	0	0
	1,00	2	0	3	0	30	10	0	0
	2,00	0	0	9	2	73	38	1	0
	3,00	1	0	16	1	171	82	11	0
D7	0,00	0	0	1	0	1	0	0	0
	0,25	0	0	4	1	7	2	0	0
	0,50	1	0	4	0	8	5	0	0
	0,75	3	0	9	0	20	11	2	0
	1,00	1	0	8	3	22	9	0	0
	2,00	0	0	3	0	88	47	4	0
	3,00	0	0	10	1	223	102	13	0
D9	0,00	0	1	7	0	2	0	0	0
	0,25	1	0	2	0	5	1	0	0
	0,50	1	0	2	0	7	2	0	0
	0,75*	5	0	12	1	17	6	0	0
	1,00	3	1	8	1	28	12	1	0
	2,00	2	1	6	0	97	48	4	0
	3,00	1	0	9	2	239	100	12	0
D11	0,00	0	0	4	2	10	1	0	0
	0,25	0	0	0	0	7	1	0	0
	0,50	2	0	1	0	17	6	0	0
	0,75	1	0	9	4	20	6	0	0
	1,00	1	1	1	0	29	10	2	0
	2,00	2	0	11	1	83	48	4	0
	3,00	1	4	3	4	189	90	13	0
D2	0,00	1	0	5	0	2	0	0	0
	0,25	1	0	0	0	6	2	0	0
	0,50	0	0	0	0	1	1	0	0
	0,75	3	0	2	0	27	16	0	0
	1,00	3	1	12	0	27	8	2	0
	2,00	5	3	4	1	84	43	6	0
	3,00	5	0	15	2	230	126	8	1
D4	0,00	0	0	2	0	3	0	0	0
	0,25	1	0	3	0	5	1	0	0
	0,50	2	0	2	0	11	1	1	0
	0,75	1	0	2	0	11	6	0	0
	1,00	1	0	5	2	37	13	0	0
	2,00	2	0	15	2	93	36	4	0
	3,00	0	0	10	0	177	89	5	0
D6	0,00	0	0	3	2	2	0	0	0
	0,25	1	0	4	0	3	0	0	0
	0,50	0	1	8	0	7	1	0	0
	0,75	3	0	11	2	17	7	0	0
	1,00	4	0	12	1	24	12	1	0
	2,00	3	0	11	2	87	35	2	0
	3,00	1	0	2	1	137	73	4	1
D8	0,00	2	0	4	2	2	0	0	0
	0,25	0	0	1	0	7	2	1	0
	0,50	0	0	8	2	22	9	0	0
	0,75	0	0	6	2	28	7	3	0
	1,00	3	0	7	1	37	20	1	0
	2,00	0	0	3	1	104	34	6	0
	3,00	0	0	6	1	202	74	14	0
D10	0,00	0	0	2	0	4	0	0	0
	0,25	1	0	2	1	11	4	0	0
	0,50	1	0	3	0	8	3	1	0
	0,75	0	0	0	0	21	5	0	0
	1,00	1	0	3	2	28	7	0	0
	2,00	0	0	8	0	78	35	6	0
	3,00	2	0	13	2	183	85	19	0
D12	0,00	1	1	0	0	5	1	0	0
	0,25	1	0	8	0	11	2	0	0
	0,50	0	2	4	0	7	2	0	0
	0,75	2	1	4	1	23	10	1	0
	1,00	0	0	2	1	25	9	1	0
	2,00	1	1	5	1	91	38	5	0
	3,00	1	1	1	3	213	97	10	0

DADOR	DOSE	CTG	CSG	CTB	CSB	ACE	DIC	ANEL	RR	DADOR	DOSE	CTG	CSG	CTB	CSB	ACE	DIC	ANEL	RR
D13	0,00	0	0	2	1	4	0	0	0	D14	0,00	3	1	8	1	7	1	0	0
	0,25	0	1	0	0	4	2	0	0		0,25	0	0	1	2	7	1	1	0
	0,50	2	0	7	2	8	2	1	0		0,50	0	3	3	0	18	8	0	0
	0,75	1	0	1	1	12	4	0	0		0,75	2	2	4	0	21	6	0	0
	1,00	2	0	1	3	39	14	1	0		1,00	1	0	0	0	35	16	0	0
	2,00	0	1	5	3	93	38	4	0		2,00	2	2	4	2	97	45	5	0
	3,00	0	2	7	1	160	73	7	0		3,00	2	0	4	4	198	108	9	0
D15	0,00	2	0	4	0	6	0	0	0	D16	0,00	0	0	2	0	6	0	0	0
	0,25	3	0	4	0	11	5	0	0		0,25	3	1	3	3	3	0	0	0
	0,50	0	0	3	0	17	3	0	0		0,50	1	0	9	2	11	3	0	0
	0,75	1	0	9	2	21	11	1	0		0,75	1	0	0	0	16	4	0	0
	1,00	1	1	13	0	26	14	0	0		1,00	1	0	7	0	29	15	0	0
	2,00	3	3	12	3	105	55	4	0		2,00	2	0	9	3	105	43	3	0
	3,00	1	1	6	7	217	105	6	0		3,00	2	0	8	1	218	102	9	0

CTG – LACUNA DE CROMÁTIDE; CSG – LACUNA DE CROMOSSOMA; CTB – QUEBRA DE CROMÁTIDE; CSB – QUEBRA DE CROMOSSOMA; ACE – FRAGMENTO ACÊNTRICO; DIC – DICÊNTRICO; RR – REARRANJO; * – 195 METAFASES CONTABILIZADAS.

Constatou-se que para todos os dadores o número de dicêntricos aumentou claramente com a dose, como seria de esperar, uma vez que é uma aberração característica da exposição à radiação. Observou-se a mesma tendência para os fragmentos acêntricos e para os anéis. Quanto às lacunas e quebras, na maioria dos dadores, não foi possível relacionar o seu aparecimento com a dose, apenas os dadores D2, D4, D5 e D10 revelaram uma tendência de aumento do número de quebras de cromátide com a dose. A frequência de rearranjos observados foi bastante baixa, sendo que só cinco dadores apresentaram este tipo de aberrações, perfazendo um total de seis rearranjos nas 22395 metafases contabilizadas.

Os valores de índice mitótico foram estudados nos 16 dadores, mas em nenhum deles foi possível estabelecer uma relação com a dose, como se pode constatar pela observação dos resultados apresentados na Tabela 3.2.

TABELA 3.2 – VALORES DO ÍNDICE MITÓTICO PARA CADA DADOR E PARA CADA DOSE, OBTIDOS APÓS A OBSERVAÇÃO DE 1000 CÉLULAS.

Dose (Gy)	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12	D13	D14	D15	D16
0,00	7	9	7	6	9	5	4	9	6	4	5	10	5	3	1	11
0,25	13	10	10	5	5	6	8	4	2	2	5	5	2	4	2	8
0,50	12	6	7	5	5	4	5	2	3	3	4	7	4	3	3	8
0,75	16	13	13	7	10	5	2	12	3	2	5	4	3	1	1	10
1,00	12	8	6	2	5	7	5	5	2	4	4	7	2	4	2	7
2,00	5	8	7	1	4	7	6	6	2	1	1	4	5	2	3	7
3,00	10	21	10	3	7	9	4	2	2	2	5	6	5	3	3	4

3.1. CURVAS DOSE-RESPOSTA

Depois de analisadas as metafases quanto à frequência de dicêntricos e dicêntricos+anéis, realizou-se o estudo de homogeneidade dos resultados referentes a cada dador (Tabela 3.3), aplicando-se o *Chi Squared Test for Homogeneity* a todas as doses. A análise dos dicêntricos revelou homogeneidade entre dadores, excepto para 0,50 e 3,0 Gy, onde as diferenças entre dadores eram estatisticamente significativas ($p=0$). No caso dos dicêntricos+anéis, a inhomogeneidade reflectiu-se nas doses de 0,50, 0,75 e 3,0 Gy, com valores de p de 0 e 0,03. Apesar da inhomogeneidade encontrada, os resultados dos 16 dadores foram todos tidos em conta para a construção das curvas dose-resposta.

TABELA 3.3 – FREQUÊNCIA DE DICÊNTRICOS E DICÊNTRICOS+ANÉIS EM FUNÇÃO DA DOSE, REFERENTES A CADA DADOR. O VALOR DE p REFERENTE AO TESTE DE HOMOGENEIDADE PARA CADA DOSE TAMBÉM SE ENCONTRA DESCRITO.

Dose (Gy)	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12	D13	D14	D15	D16	p
0,00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0,60
0,25	1	2	1	1	1	0	2	2	1	4	1	2	2	1	5	0	0,39
0,50	1	1	8	1	0	1	5	9	2	3	6	2	2	8	3	3	0,00
0,75	7	16	5	6	3	7	11	7	6	5	6	10	4	6	11	4	0,07
1,00	5	8	13	13	10	12	9	20	12	7	10	9	14	16	14	15	0,25
2,00	50	43	44	36	38	35	47	34	48	35	48	38	38	45	55	43	0,53
3,00	56	126	135	89	82	73	102	74	100	85	90	97	73	108	105	102	0,00
0,00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0,60
0,25	1	2	1	1	1	0	2	3	1	4	1	2	2	2	5	0	0,42
0,50	1	1	8	2	0	1	5	9	2	4	6	2	3	8	3	3	0,00
0,75	7	16	6	6	3	7	13	10	6	5	6	11	4	6	12	4	0,03
1,00	5	10	13	13	10	13	9	21	13	7	12	10	15	16	14	15	0,28
2,00	55	49	47	40	39	37	51	40	52	41	52	43	42	50	59	46	0,57
3,00	66	134	140	94	93	77	115	88	112	104	103	107	80	117	111	111	0,00

Depois de analisada a homogeneidade entre dadores agruparam-se todos os resultados para a construção da curva dose-resposta para dicêntricos e para dicêntricos+anéis. De seguida foram calculados os valores de u e do índice de dispersão para ambos os *endpoints* a fim de se analisar se as distribuições de dicêntricos e de dicêntricos+anéis seguiam uma distribuição de Poisson, encontrando-se os valores descritos nas Tabelas 3.4 e 3.5, respectivamente. No caso dos dicêntricos, observou-se uma ligeira tendência de aumento dos valores de índice de dispersão com a dose, variando entre 0,999 em 0 Gy e 1,134 em 3 Gy. Verificou-se que a distribuição de dicêntricos era Poissoniana para as doses mais baixas ($u < \pm 1,96$), revelando sobredispersão nas doses mais altas. Resultados semelhantes foram obtidos para os dicêntricos+anéis, verificando-se uma sobredispersão nas doses mais altas e a mesma tendência de aumento dos valores de índice de dispersão com a dose, variando entre 0,999 em 0 Gy e 1,137 em 3 Gy. Contudo, apesar da sobredispersão observada assumiu-se que os dicêntricos e dicêntricos+anéis seguiam uma distribuição de Poisson.

TABELA 3.4 – POOL E DISTRIBUIÇÃO DE DICÊNTRICOS DOS 16 DADORES ESTUDADOS PARA A OBTENÇÃO DA CURVA DOSE-RESPOSTA PARA DICÊNTRICOS. A CURVA DOSE-RESPOSTA ENCONTRA-SE DESCRITA COM OS VALORES DO TESTE DE GOODNESS-OF-FIT. OS VALORES DE u E DO ÍNDICE DE DISPERSÃO TAMBÉM SÃO APRESENTADOS.

DOSE (Gy)	N.º METAFASES	DICÊNTRICOS	DISTRIBUIÇÃO DE DICÊNTRICOS						u	σ^2/Y
			0	1	2	3	4	5		
0,00	3200	3	3197	3	0	0	0	0	-0,03	0,999
0,25	3200	26	3174	26	0	0	0	0	-0,32	0,992
0,50	3200	55	3146	53	1	0	0	0	0,79	1,019
0,75	3195	114	3083	110	2	0	0	0	-0,01	1,000
1,00	3200	187	3024	165	11	0	0	0	2,39	1,060
2,00	3200	677	2611	512	66	11	0	0	3,25	1,081
3,00	3200	1497	2066	846	224	54	9	1	5,35	1,134
$Y = (0,0011 \pm 0,0006) + (0,0105 \pm 0,0035)D + (0,0480 \pm 0,0019)D^2$						$\chi^2 = 1,5$; graus de liberdade = 4; $p = 0,91$				

As curvas dose-resposta para dicêntricos (Tabela 3.4) e para dicêntricos+anéis (Tabela 3.5) foram então construídas utilizando o *software* CABAS e o *software* Dose Estimate. Para cada um dos *endpoints* os resultados obtidos com os dois *softwares* foram semelhantes, mostrando apenas ligeiras diferenças ao nível da quinta casa decimal nos erros dos coeficientes.

TABELA 3.5 – POOL E DISTRIBUIÇÃO DE DICÊNTRICOS+ANÉIS DOS 16 DADORES ESTUDADOS PARA A OBTENÇÃO DA CURVA DOSE-RESPOSTA PARA DICÊNTRICOS+ANÉIS. A CURVA DOSE-RESPOSTA ENCONTRA-SE DESCRITA COM OS VALORES DO TESTE DE GOODNESS-OF-FIT. OS VALORES DE u E DO ÍNDICE DE DISPERSÃO TAMBÉM SÃO APRESENTADOS.

DOSE (Gy)	N.º METAFASES	DICÊNTRICOS +ANÉIS	DISTRIBUIÇÃO DE DICÊNTRICOS+ANÉIS						u	σ^2/Y
			0	1	2	3	4	5		
0,00	3200	3	3197	3	0	0	0	0	-0,03	0,999
0,25	3200	28	3172	28	0	0	0	0	-0,34	0,992
0,50	3200	58	3143	56	1	0	0	0	0,67	1,017
0,75	3195	122	3076	116	3	0	0	0	0,45	1,011
1,00	3200	196	3015	174	11	0	0	0	2,06	1,051
2,00	3200	743	2562	547	77	14	0	0	3,54	1,088
3,00	3200	1652	1978	886	255	70	9	2	5,47	1,137
$Y = (0,0011 \pm 0,0006) + (0,0095 \pm 0,0036)D + (0,0536 \pm 0,0020)D^2$						$\chi^2 = 2,6$; graus de liberdade = 4; $p = 0,81$				

Os testes de *goodness-of-fit* para as curvas de calibração estabelecidas revelaram que estas se ajustam bem ao modelo linear-quadrático uma vez que, em ambos os casos, o valor do χ^2 é inferior ao número de graus de liberdade. Constatou-se igualmente que houve uma diminuição do valor de α e um aumento do valor de β quando se incluiu os anéis na curva de calibração.

Depois de se obter as curvas dose-resposta para dicêntricos e para dicêntricos+anéis procedeu-se ao cálculo dos intervalos de confiança de 95%. Os intervalos foram corrigidos de acordo com as recomendações da IAEA (2011), nos casos onde existia sobredispersão. As curvas obtidas após determinação dos parâmetros α e β para dicêntricos e dicêntricos+anéis, bem como os intervalos de confiança de 95%, encontram-se ilustrados nas Figuras 3.1 e 3.2, respectivamente. As frequências de dicêntricos e de dicêntricos+anéis também se encontram representadas e, como seria de esperar,

verificou-se um claro aumento do número de dicêntricos e de dicêntricos+anéis com a dose. Observou-se também que esse aumento é ligeiramente mais acentuado no caso dos dicêntricos+anéis.

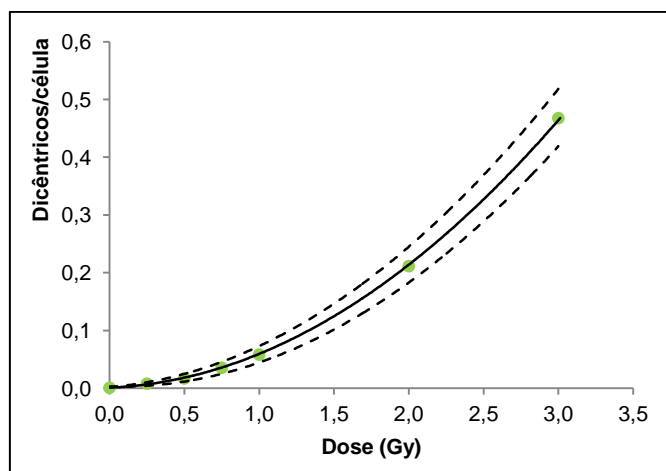


FIGURA 3.2 – CURVA DOSE-RESPOSTA PARA DICÊNTRICOS.

● FREQUÊNCIA DE DICÊNTRICOS POR CÉLULA; — CURVA DOSE-RESPOSTA. --- INTERVALOS DE CONFIANÇA DE 95%.

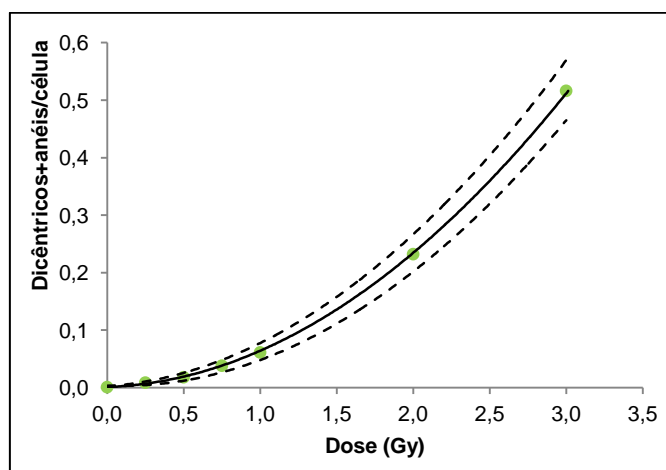


FIGURA 3.3 – CURVA DOSE-RESPOSTA PARA DICÊNTRICOS+ANÉIS.

● FREQUÊNCIA DE DICÊNTRICOS+ANÉIS POR CÉLULA; — CURVA DOSE-RESPOSTA; --- INTERVALOS DE CONFIANÇA DE 95%.

3.1.1. VALIDAÇÃO DAS CURVAS DOSE-RESPOSTA

Para a validação das curvas dose-resposta efectuamos um estudo com três dadores. O sangue dos dadores A, B e C foi irradiado *in vitro* com uma dose de 1,75 Gy, simulando uma exposição de corpo inteiro. Depois de contabilizado o número de dicêntricos e de dicêntricos+anéis, a dose foi estimada tendo em conta as respectivas equações: $Y_{\text{dicêntricos}} = (0,0011 \pm 0,0006) + (0,0105 \pm 0,0035)D + (0,0480 \pm 0,0019)D^2$ e $Y_{\text{dicêntricos+anéis}} = (0,0011 \pm 0,0006) + (0,0095 \pm 0,0036)D + (0,0536 \pm 0,0020)D^2$. O número de dicêntricos e de dicêntricos+anéis contabilizados, bem como os valores de dose estimados e os respectivos intervalos de confiança de 95% encontram-se descritos nas Tabelas 3.6 e

3.7, respectivamente. Verificou-se que as doses estimadas estavam de acordo com a dose real, sendo que apenas para o dador C, e tendo em conta apenas os dicêntricos, a dose real está ligeiramente abaixo do intervalo de confiança de 95%. Adicionalmente foram calculados os valores de u e de índice de dispersão para cada dador, para o caso dos dicêntricos e dos dicêntricos+anéis. Todos os valores de u obtidos seguiam uma distribuição de Poisson ($u < \pm 1,96$) e os valores de índice de dispersão estavam todos perto de 1. Paralelamente, observou-se que dos três indivíduos estudados, o trabalhador exposto (DR B) apresentou menor número de dicêntricos e dicêntricos+anéis do que os indivíduos não expostos, embora as diferenças não fossem estatisticamente significativas.

TABELA 3.6 – ESTIMATIVA DAS DOSES PARA A VALIDAÇÃO DA CURVA DOSE-RESPOSTA DE DICÊNTRICOS.

DADOR	N.º METAFASES	DICÊNTRICOS	DISTRIBUIÇÃO DE DICÊNTRICOS				u	σ^2/y	DOSE ESTIMADA (Gy)	INTERVALO DE CONFIANÇA (95%)
			0	1	2	3				
Dador A	400	76	328	69	2	1	-0,80	0,944	1,88	1,65 – 2,11
Dador B	400	68	338	57	4	1	0,55	1,038	1,77	1,55 – 2,01
Dador C	200	47	161	31	8	0	1,12	1,111	2,10	1,78 – 2,44

TABELA 3.7 – ESTIMATIVA DAS DOSES PARA A VALIDAÇÃO DA CURVA DOSE-RESPOSTA DE DICÊNTRICOS+ANÉIS.

DADOR	N.º METAFASES	DICÊNTRICOS + ANÉIS	DISTRIBUIÇÃO DE DICÊNTRICOS + ANÉIS				u	σ^2/y	DOSE ESTIMADA (Gy)	INTERVALO DE CONFIANÇA (95%)
			0	1	2	3				
Dador A	400	79	327	68	4	1	-0,25	0,982	1,83	1,62 – 2,05
Dador B	400	72	335	59	5	1	0,64	1,045	1,74	1,53 – 1,97
Dador C	200	49	159	33	8	0	0,88	1,087	2,05	1,75 – 2,37

3.2. COMPARAÇÃO ENTRE DADORES

Uma vez que foi tida em conta a variabilidade entre indivíduos na construção da curva dose-resposta, havendo uma distribuição homogênea de dadores do sexo masculino e feminino entre os 20 e os 59 anos, foi possível estudar quais as diferenças entre géneros e faixas etárias. Os estudos foram feitos com os mesmos *endpoints* utilizados na elaboração das curvas dose-resposta, dicêntricos e dicêntricos+anéis. Estudou-se também o comportamento entre géneros e faixas etárias contabilizando o número total de aberrações cromossómicas para cada dador (Tabela 3.1)

Para a comparação entre géneros tivemos em conta o número de dicêntricos, dicêntricos+anéis e aberrações cromossómicas por célula obtidos para cada um dos dadores e determinou-se a média e o desvio padrão para o sexo masculino (D1, D4, D6, D8, D10, D11, D13 e D14) e feminino (D2, D3, D5, D7, D9, D12, D15 e D16). Os valores obtidos para dicêntricos, dicêntricos+anéis e aberrações cromossómicas por célula encontram-se representados nas Figuras 3.3, 3.4 e 3.5, respectivamente. Após a análise dos resultados verificou-se que as diferenças apenas existiam para a dose mais alta, revelando as mulheres maior radiosensibilidade que os homens, sendo essa diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) para todos os *endpoints*.

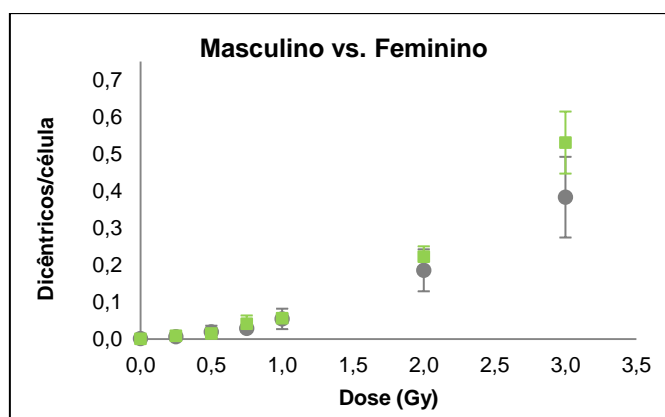


FIGURA 3.4 – COMPARAÇÃO DO NÚMERO DE DICÊNTRICOS POR CÉLULA ENTRE OS DADORES DO SEXO MASCULINO (●) E FEMININO (■).

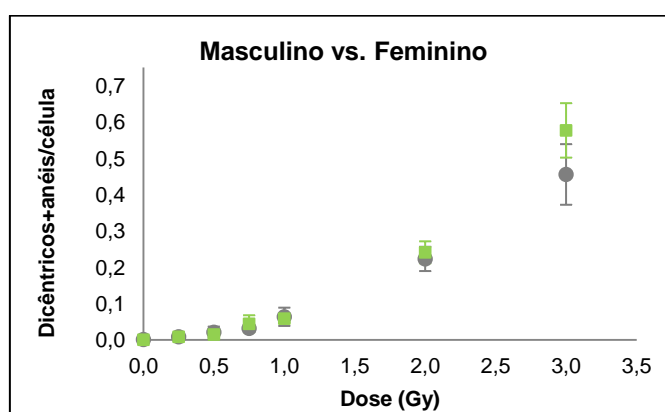


FIGURA 3.5 – COMPARAÇÃO DO NÚMERO DE DICÊNTRICOS+ANÉIS POR CÉLULA ENTRE OS DADORES DO SEXO MASCULINO (●) E FEMININO (■).

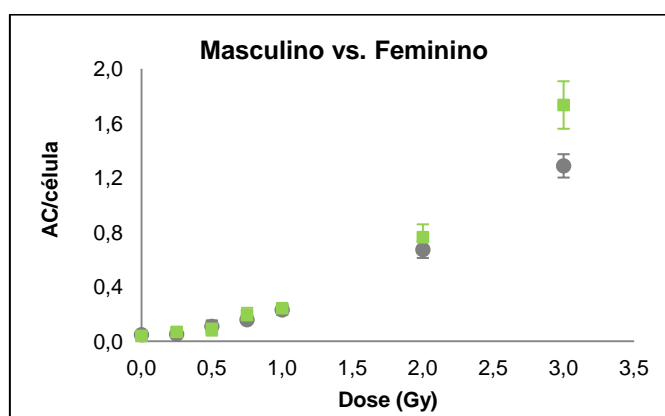


FIGURA 3.6 – COMPARAÇÃO DO NÚMERO DE ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS (AC) POR CÉLULA ENTRE OS DADORES DO SEXO MASCULINO (●) E FEMININO (■).

Para a análise dos dadores por faixas etárias procedeu-se do mesmo modo que para o estudo entre géneros. Contudo, quando se dividiram os dadores em duas faixas etárias, dos 20-39 anos (D2, D3, D4, D5, D6, D7, D8 E D11) e dos 40-59 anos (D1, D9, D10, D12, D13, D14, D15 e D16), as

diferenças foram praticamente inexistentes para todas as doses, como se pode observar pela representação das médias e desvios padrão nas Figuras 3.6, 3.7 3.8, respectivamente.

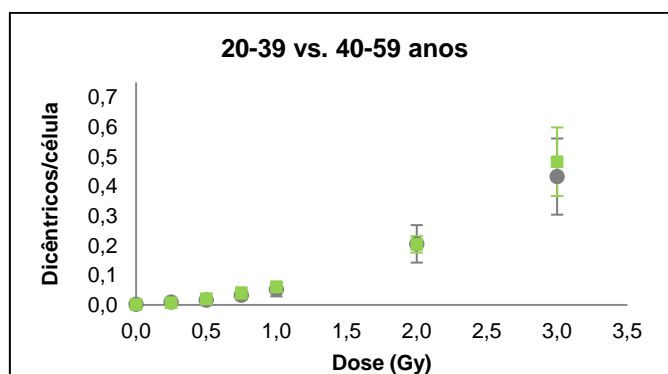


FIGURA 3.7 – COMPARAÇÃO DO NÚMERO DE DICÊNTRICOS POR CÉLULA ENTRE OS DADORES DA FAIXA ETÁRIA DOS 20-39 ANOS (■) E DOS 40-59 ANOS (●).

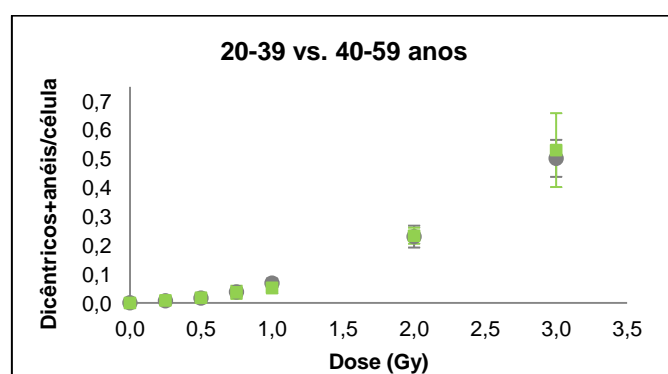


FIGURA 3.8 – COMPARAÇÃO DO NÚMERO DE DICÊNTRICOS+ANÉIS POR CÉLULA ENTRE OS DADORES DA FAIXA ETÁRIA DOS 20-39 ANOS (■) E DOS 40-59 ANOS (●).

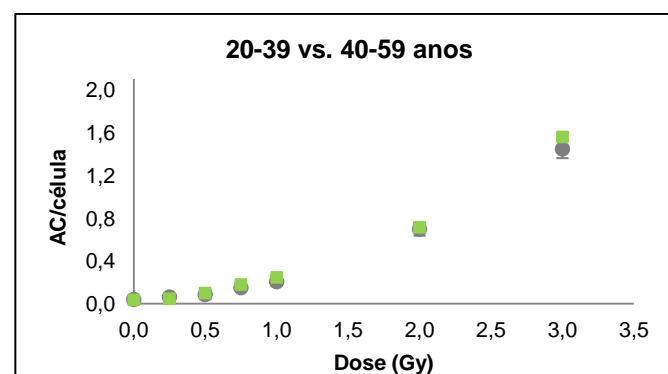


FIGURA 3.9 – COMPARAÇÃO DO NÚMERO DE ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS (AC) POR CÉLULA ENTRE OS DADORES DA FAIXA ETÁRIA DOS 20-39 ANOS (■) E DOS 40-59 ANOS (●).

Quando se analisaram a totalidade das aberrações cromossômicas (Figura 3.8), verificou-se uma ligeira diferença entre os dadores da faixa etária dos 20-39 e dos 40-59 anos, apresentando os primeiros uma maior radiosensibilidade, embora essa diferença não fosse estatisticamente significativa.

Observou-se também que as diferenças para 3 Gy foram sempre mais acentuadas no número de aberrações cromossômicas por célula do que nos restantes *endpoints*, tanto para a comparação entre géneros como entre faixas etárias. Verificou-se igualmente que para as aberrações cromossômicas por célula os desvios padrão eram menores que nos dicêntricos e dicêntricos+anéis.

4. DISCUSSÃO

Desde 1962 que a técnica das aberrações cromossómicas em linfócitos do sangue periférico, considerando o dicêntrico como principal *endpoint*, tem sido extensivamente utilizada para a estimativa de doses em protecção radiológica (Agrawala *et al.*, 2010; Bender e Gooch, 1962; Lloyd, 1998; Romm *et al.* 2009; Stephan *et al.*, 2007). Tendo em conta as recomendações da IAEA (2001), que sugerem que cada laboratório deve ter a sua curva dose-resposta, procedeu-se à implementação na IST/ITN de uma curva dose-resposta para dicêntricos e para dicêntricos+anéis. O estudo foi realizado com uma amostra constituída por 16 dadores saudáveis, para que a intervariabilidade de resposta à radiação fosse tida em conta, uma vez que é conhecido que a capacidade de resposta de exposição a radiação ionizante é intrínseca a cada indivíduo (radiossensibilidade) e introduz alguma incerteza na estimativa da dose (Lloyd e Purrott, 1981; Terzoudi e Pantelias, 2006). Este facto foi confirmado uma vez que, após a aplicação do teste de homogeneidade, se verificaram diferenças estatisticamente significativas para 0,50 e 3,0 Gy nos dois *endpoints* e também para 0,75 Gy no caso dos dicêntricos+anéis. No caso dos fragmentos acêntricos verificou-se igualmente uma elevada intervariabilidade nas doses mais altas.

As curvas dose-resposta para dicêntricos e dicêntricos+anéis foram construídas segundo o modelo linear-quadrático: $Y = c + \alpha D + \beta D^2$. Para as duas curvas os valores de u estavam acima de 1,96 em três doses (1, 2 e 3 Gy), mostrando sobredispersão. Não existe uma explicação óbvia para este facto, que pode ser causado por factores, como por exemplo, exposições não uniformes (Ramalho *et al.*, 1988). Apesar da sobredispersão, mas tendo em conta que os valores do índice de dispersão estavam próximos de 1, assumiu-se que a distribuição de dicêntricos e dicêntricos+anéis era Poissoniana (Barquinero *et al.*, 1995; Edwards *et al.*, 1979; Senthamizhchelvan *et al.*, 2007). Em consequência da sobredispersão verificada, os intervalos de confiança de 95% foram ajustados tendo em conta os valores do índice de dispersão uma vez que, segundo a IAEA (2011), os valores de σ^2/Y devem ser contabilizados no cálculo dos intervalos de confiança, sempre que estes apresentem uma tendência de aumento com a dose e se verifique sobredispersão. Depois de se estabelecerem as curvas dose-resposta, procedeu-se à comparação dos nossos coeficientes com os de outros laboratórios (Tabela 4.1), verificando-se que os valores estavam próximos dos valores da literatura. Verificou-se igualmente que os nossos coeficientes α e β são muito semelhantes aos de outros estudos anteriormente publicados (Bauchinger *et al.*, 1983; Lindholm *et al.*, 1998). As diferenças entre laboratórios existem e podem ser atribuídas a diversos factores como a taxa de dose, o número de células analisadas, os critérios de leitura e a experiência dos operadores (Barquinero *et al.*, 1995; Beinke *et al.*, 2010). Comparativamente aos resultados obtidos por outros laboratórios (Barquinero *et al.*, 1995; Köksal *et al.*, 1995; Lloyd *et al.*, 1986), o valor de β por nós obtido é inferior, podendo ficar a dever-se à baixa taxa de dose, implicando irradiações mais longas. O facto do tempo de irradiação ser maior leva a que o número de aberrações obtidas não seja tão elevado, uma vez que durante irradiações mais prolongadas haverá maior taxa de reparação, fazendo com que o número de

dicêntricos seja menor, uma vez que se uma ionização for reparada antes de ocorrer outra, haverá menor formação de dicêntricos (IAEA, 2011). Devido a estes factores, é aconselhável que cada laboratório possua a sua curva dose-resposta, para que o estudo de um indivíduo exposto seja realizado em condições idênticas às utilizadas na elaboração da curva (IAEA 2011; Stephan *et al.*, 2007). Paralelamente constatou-se que considerando o *pool* dos dadores, o *background* de dicêntricos era cerca de 0,9 dicêntricos por 1000 células, estando de acordo com valores publicados (Barquinero *et al.*, 1995; Koksai *et al.*, 1995; Senthamizhchelvan *et al.*, 2007), sendo também essa a frequência de dicêntricos esperada em indivíduos não irradiados (Ainsbury *et al.*, 2011; IAEA, 2011; Romm *et al.*, 2009).

TABELA 4.1 – VALORES DE COEFICIENTES α E β PARA DICÊNTRICOS E RESPECTIVOS PARÂMETROS DE *GOODNESS-OF-FIT* RETIRADOS DA LITERATURA. OS VALORES OBTIDOS NO PRESENTE TRABALHO TAMBÉM SE ENCONTRAM DESCRITOS.

REFERÊNCIA	TAXA DOSE (Gy MIN ⁻¹)	$\alpha \pm SE$ (Gy ⁻¹)	$\beta \pm SE$ (Gy ⁻²)	χ^2	GRAUS DE LIBERDADE
Bauchinger <i>et al.</i> (1983)	0,02	0,0090 \pm 0,0040	0,0417 \pm 0,0028	-	-
Bauchinger <i>et al.</i> (1983)	0,50	0,0107 \pm 0,0041	0,0555 \pm 0,0028	-	-
Lloyd <i>et al.</i> (1986)	0,50	0,0142 \pm 0,0044	0,0759 \pm 0,0027	11,7	13
Barquinero <i>et al.</i> (1995)	1,18-1,07	0,0210 \pm 0,0052	0,0631 \pm 0,0040	6,6	-
Köksai <i>et al.</i> (1995)	0,40	0,0209 \pm 0,0057	0,0711 \pm 0,0025	8,5	7
Lindholm <i>et al.</i> (1998)	0,24	0,0135 \pm 0,0043	0,0544 \pm 0,0034	-	-
Presente trabalho	0,18-0,13	0,0105 \pm 0,0035	0,0480 \pm 0,0019	1,5	4

Confrontando os coeficientes α e β obtidos para as duas curvas, verificou-se que quando se incluiu os anéis no estudo o parâmetro linear diminuiu enquanto o parâmetro quadrático aumentou, face aos valores obtidos para os dicêntricos. Este resultado pode ter ficado a dever-se ao facto dos anéis serem mais frequentes nas doses mais elevadas, não contribuindo para o parâmetro linear, apenas para o parâmetro quadrático da curva. As diferenças também são observáveis na análise das Figuras 3.1 e 3.2, verificando-se um aumento mais acentuado em função da dose no caso dos dicêntricos+anéis.

Após o estabelecimento das curvas de calibração, realizou-se uma experiência para validação das mesmas onde foram estudados três indivíduos, sendo um dos dadores um trabalhador ocupacionalmente exposto. Pela análise do número de dicêntricos e dicêntricos+anéis, observaram-se diferenças entre os dadores, não sendo estas estatisticamente significativas. O trabalhador exposto apresentou menor número de cromossomas dicêntricos e dicêntricos+anéis em relação aos outros dadores. Barquinero *et al.* (1995), num estudo semelhante realizado com seis indivíduos observou a mesma tendência. Após a estimativa das doses verificou-se que estas estavam de acordo com a dose real, sendo que somente para o dador C, e tendo em conta apenas os dicêntricos, a dose real se encontrava ligeiramente abaixo do intervalo de confiança de 95%. Paralelamente aos resultados obtidos na validação, verificou-se que não existem diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) entre as curvas dose-resposta implementadas e que os testes de *goodness-of-fit* não apresentam variações relevantes. Por tudo isto, os resultados obtidos dão-nos confiança para

aplicar as curvas implementadas no caso de ser necessário recorrer à dosimetria biológica para estimativa de doses em Portugal.

Analisou-se igualmente a existência ou não de diferenças entre os 16 dadores, observando-se uma maior variabilidade na dose mais alta, sendo que estas diferenças na resposta à radiação estão relacionadas com a radiosensibilidade de cada indivíduo (Barquinero *et al.*, 1995; Terzoudi e Pantelias, 2006; Voisin *et al.*, 2004). Na comparação entre géneros observaram-se diferenças estatisticamente significativas na dose de 3 Gy. Maffei *et al.* (2004) encontrou um comportamento semelhante num estudo que envolvia trabalhadores de um hospital, ocupacionalmente expostos. Contudo, a análise da literatura revela que existem estudos que reflectem o contrário. Venkatachalam *et al.* (1999), concluiu que a utilização da mesma curva dose-resposta em homens e mulheres não apresentava diferenças nos resultados. Senthamizhchelvan *et al.* (2007) obteve resultados idênticos num estudo que envolvia quatro homens e uma mulher, com doses entre 0,1 e 4 Gy.

Quando se compararam os resultados em termos de faixas etárias, não se verificaram diferenças acentuadas nos *endpoints* estudados. Contudo, verificou-se que em todos os *endpoints* os indivíduos da faixa etária dos 40-59 anos apresentaram sempre menor número de aberrações cromossómicas. A relação entre a idade e o número de aberrações cromossómicas não se encontra clarificada, existem estudos onde os autores encontraram uma associação entre a idade e a frequência de aberrações (Bolognesi *et al.*, 1997), enquanto outros estudos não encontraram qualquer relação (Maffei *et al.*, 2004).

No geral, os nossos resultados apontam para uma variação interindividual de resposta à radiação, especialmente na dose mais elevada. As variações observadas podem ser resultantes de diferenças na capacidade de reparação do DNA, que podem ser explicadas por mutações específicas ou polimorfismos em genes de reparação, ou, alternativamente, podem estar relacionadas com alterações no ciclo celular (Terzoudi e Pantelias, 2006).

5. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS

Nas últimas décadas tem-se assistido à crescente utilização de fontes de radiação ionizante em diversas vertentes, como é o caso das aplicações médicas e industriais. A possibilidade de ocorrência de eventos radiológicos em larga escala, bem como de ataques terroristas utilizando fontes de radiação ionizante exigem uma elevada capacidade de resposta quer a nível nacional, quer a nível internacional. Assim, para ampliar esta capacidade de resposta torna-se necessário que cada laboratório que desenvolva actividades de dosimetria biológica possua a sua curva dose-resposta.

A implementação das curvas dose-resposta resultantes deste trabalho permite à IST/ITN ter capacidade de resposta a nível nacional, no caso de haver alguma suspeita de sobreexposição a radiação ionizante resultante de um incidente/acidente radiológico. A nível europeu desenvolvem-se actualmente grupos de trabalho em que participam diversos institutos ligados à protecção radiológica, tendo em vista a criação de *networks* que possuam capacidade de resposta no caso de ocorrer um acidente radiológico em larga escala. Assim, a conclusão deste trabalho permite à IST/ITN ingressar nessas *networks*, uma vez que um dos principais requisitos para os laboratórios poderem participar é possuírem uma curva dose-resposta.

Como perspectiva futura, pretendemos estabelecer uma curva dose-resposta utilizando a técnica do micronúcleo com a citocinese bloqueada e tentar correlacioná-la com as curvas obtidas no presente trabalho. A técnica dos micronúcleos permite uma avaliação mais rápida, embora com menor sensibilidade, da lesão genotóxica induzida, podendo ser usada como alternativa à técnica das aberrações cromossómicas no caso de emergências radiológicas e/ou acidentes nucleares que envolvam um elevado número de pessoas, onde uma rápida avaliação da lesão é da maior importância.

6. BIBLIOGRAFIA

- Agrawala, P.K., Adhikari, J.S. e Chaudhury, N.K. 2010. Lymphocyte chromosomal aberration assay in radiation biodosimetry. *Journal of Pharmacy and Bioallied Science* 2(3):197-201.
- Ainsbury, E.A. e Lloyd, D.C. 2010. Dose estimation software for radiation biodosimetry. *Health Physics* 98(2):290-295.
- Ainsbury, E.A., Bakhanova, E., Barquinero, J.F., Brai, M., Chumak, V., Correcher, V., Darroudi, F., Fattibene, P., Gruel, G., Guclu, I., Horn, S., Jaworska, A., Kulka, U., Lindholm, C., Lloyd, D., Longo, A., Marrale, M., Monteiro Gil, O., Oestreicher, U., Pajic, J., Rakic, B., Romm, H., Trompier, F., Veronese, I., Voisin, P., Vral, A., Whitehouse, C.A., Wieser, A., Woda, C., Wojcik, A. e Rothkamm, K. 2011. Review of retrospective dosimetry techniques for external ionising radiation exposures. *Radiation Protection Dosimetry* 147(4):573-92.
- Barquinero, J.F., Barrios, L., Caballín, M.R., Miró, R., Ribas, M., Subias, A., e Egozcue, J. 1995. Establishment and validation of a dose-effect curve for γ -rays by cytogenetic analysis. *Mutation Research* 326:65-69.
- Bauchinger, M., Schmid, E., Streng, S. e Dresch, J. 1983. Quantitative analysis of the chromosome damage at first division of human lymphocytes after ^{60}Co γ -irradiation. *Radiation and Environmental Biophysics* 22:225-229.
- Beinke, C., Braselmann, H. e Meineke, V. 2010. Establishment of an x-ray standard calibration curve by conventional dicentric analysis as prerequisite for accurate radiation dose assessment. *Health Physics* 98(2):261-268.
- Bender, N.M. e Gooch, P.C. 1962. Types and rates of X-ray induced chromosome aberrations in human blood irradiated *in vitro*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 48:522-32.
- Blakely, W.F., Salter, C.A. e Prasanna, P.G. 2005. Early-Response Biological Dosimetry-Recommended Countermeasure Enhancements for Mass-Casualty Radiological Incidents and Terrorism. *Health Physics* 89(5):494-504.
- Bolognesi, C., Abbondandolo, A., Barale, R., Casalone, R., Dalprà, L., De Ferrari, M., Degrossi, F., Forni, A., Lamberti, L., Lando, C., Migliore, L., Padovani, P., Pasquini, R., Puntoni, R., Sbrana, I., Stella, M. e Bonassi, S. 1997. Age-related increase of baseline frequencies of sister chromatid exchanges, chromosome aberrations, and micronuclei in human lymphocytes. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 6:249-256.
- Bolognesi, C., Balia, C., Roggieri, P., Cardinale, F., Bruzzi, P., Sorcinelli, F., Lista, F., D'Amelio, R. e Righi, E. 2011. Micronucleus test for radiation biodosimetry in mass casualty events: Evaluation of visual and automated scoring. *Radiation Measurements* 46:169-175.

- Bonassi, S. e Au, W.W. 2002. Biomarkers in molecular epidemiology studies for health risk prediction. *Mutation Research* 511:73-86.
- de Lemos Pinto, M., Santos, N.F. e Amaral, A. 2010. Current status of biodosimetry based on standard cytogenetic methods. *Radiation and Environmental Biophysics* 49:567-581.
- Dean, B.J. e Danford, N. 1984. Assays for the detection of chemically-induced chromosome damage in cultured mammalian cells. *In* *Mutagenicity testing: a practical approach* (Venitt, S. e Parry, J.M. eds) pp187-232, IRL Press, Oxford – Washington D.C..
- Deperas, J., Szłuińska, M., Deperas-Kaminska, M., Edwards, A., Lloyd, D., Lindholm, C., Romm, H., Roy, L., Moss, R., Morand, J. e Wojcik, A. 2007. CABAS: A freely available pc program for fitting calibration curves in chromosome aberration dosimetry. *Radiation Protection Dosimetry* 124(2):115-123.
- Doll, R. 1998. Effects of small doses of ionizing radiation. *Journal of Radiological Protection* 18(3):163-174.
- Edwards, A.A. e Lloyd, D.C. 1998. Risks from ionizing radiation: deterministic effects. *Journal of Radiological Protection* 18(3):175-183.
- Edwards, A.A., Lloyd, D.C. e Purrott, R.J. 1979. Radiation induced Chromosome Aberrations and the Poison Distribution. *Radiation and Environmental Biophysics* 16:89-100.
- González, A.J. 2007. An international perspective on radiological threats and the need for retrospective biological dosimetry of acute radiation overexposures. *Radiation Measurements* 42:1053-1062.
- Hadjidekova, V., Hristova, R., Ainsbury, E.A., Atanasova, P., Popova, L. e Staynova, A. 2010. The use of the dicentric assay for biological dosimetry for radiation accidents in Bulgaria. *Health Physics* 98(2):252-257.
- Han, W. e Yu, K.N. 2010. Chapter 7 – Ionizing Radiation, DNA Double Strand Break and Mutation. *In* *Advances in Genetics Research* (Editor Urbano K.V.), Nova Science Publishers, Inc.
- IAEA 2001. Cytogenetic Analysis for Radiation Dose Assessment – A Manual. International Atomic Energy Agency Technical Reports Series No.405, Vienna.
- IAEA 2004. Radiation, People and the Environment. International Atomic Energy Agency, Austria.
- IAEA 2010. Radiation Biology: a Handbook for Teachers and Students. International Atomic Energy Agency Training course series No.42, Vienna.
- IAEA 2011. Cytogenetic Dosimetry: Applications in Preparedness for and Response to Radiation Emergencies. International Atomic Energy Agency, Vienna.

- ICRP 2007. ICRP Publication 103 – The 2007 Recommendations of the International Commission on Radiological Protection.
- Iwasaki, T., Takashima, Y., Suzuki, T., Yoshida, M.A. e Hayata, I. 2011. The Dose Response of Chromosome Aberrations in Human Lymphocytes Induced *In Vitro* by Very Low-Dose γ -Rays. *Radiation Research* 175(2): 208-213.
- Klaassen, C.D. 1996. Casarett & Doull's Toxicology: The Basic Science of poisons. 5^a ed., McGraw-Hill, New York.
- Koksal, G., Pala, F.S. e Dalci, D.O. 1995. In vitro dose-response curve for chromosome aberrations induced in human lymphocytes by ^{60}Co γ -radiation. *Mutation Research* 329:57-61.
- Léonard, A., Deknudt, Gh. e Léonard, E.D. 1988. Persistence of chromosome aberrations in an accidentally irradiated subject. *Radiation Protection Dosimetry* 22(1):55-57.
- Léonard, A., Rueff, J., Gerber, G.B. e Léonard, E.D. 2005. Usefulness and limits of biological dosimetry based on cytogenetic methods. *Radiation Protection Dosimetry* 115(1-4):448-454.
- Lindholm, C., Luomahaara, S., Koivistoinen, A., Ilus, T., Edwards, A.A. e Salomaa, S. 1998. Comparison of dose-response curves for chromosomal aberrations established by chromosome painting and conventional analysis. *International Journal of Radiation Biology* 74:27-34.
- Little, M.P. 2003. Risks associated with ionizing radiation. *British Medical Bulletin* 68:259-275.
- Lloyd, D.C. 1997. Chromosomal Analysis to Assess Radiation Dose. *Stem Cells* 15(2):195-201.
- Lloyd, D.C. 1998. New developments in chromosomal analysis for biological dosimetry. *Radiation Protection Dosimetry* 77(1/2):33-36.
- Lloyd, D.C. e Purrott, R.J. 1981. Chromosome aberration analysis in radiological protection dosimetry. *Radiation Protection Dosimetry* 1(1):19-28.
- Lloyd, D.C., Edwards, A.A. e Prosser, J.S. 1986. Chromosome aberrations induced in human lymphocytes by *in vitro* acute x and gamma radiation. *Radiation Protection Dosimetry* 15(2):83-88.
- Lloyd, D.C., Purrott, R.J., Dolphin, G.W., Bolton, D. e Edwards, A.A. 1975. The relationship between chromosome aberrations and low LET radiation dose to human lymphocytes. *International Journal of Radiation Biology* 28(1):75-90.
- Madhvanath, U. 1976. Lymphocyte as a Biological Dosimeter: a Different Approach. *Health Physics* 30:299-302.
- Maffei, F., Angelini, S., Cantelli Forti, G., Violante, F.S., Lodi, V., Mattioli, S. e Hrelia, P. 2004. Spectrum of chromosomal aberrations in peripheral lymphocytes of hospital workers occupationally exposed to low doses of ionizing radiation. *Mutation Research* 547:91-99.

- Martins, V., Antunes, A.C e Monteiro Gil, O. 2013. Implementation of a dose-response curve for γ -radiation in the Portuguese population using the chromosomal aberration assay. *Mutation Research* 750:50-54.
- Monteiro Gil, O., Oliveira, N.G., Rodrigues, A.S., Laires, A., Ferreira, T.C., Limbert, E., Léonard, A., Gerber, G. e Rueff, J. 2000. Cytogenetic alterations and oxidative stress in thyroid cancer patients after iodine-131 therapy. *Mutagenesis* 15(1):69-75.
- Natarajan, A.T. e Palitti, F. 2008. DNA repair and chromosomal alterations. *Mutation Research* 657:3-7.
- Nowel, P.C. 1960. Phytohemagglutinin: An Initiator of Mitosis in Cultures of Normal Human Leukocytes. *Cancer Research* 20:462-466.
- Obe, G., Pfeiffer, P., Savage, J.R.K., Johannes, C., Goedecke, W., Jeppesen, P., Natarajan, A.T., Martínez-López, W., Folle, G.A. e Drets, M.E. 2002. Chromosomal aberrations: formation, identification and distribution. *Mutation Research* 504:17-36.
- Oliveira, A. e Pedroso de Lima, J.J. 2008. Dosimetria e efeitos biológicos da radiação. In *Física em Medicina Nuclear – Temas e Aplicações*, pp 479-556, Imprensa da Universidade de Coimbra, Coimbra.
- Papworth, D. 1975. Curve fitting by maximum likelihood. *Radiation Botany* 15:127-131.
- Ramalho, A.T. e Nascimento, A.C.H. 1991. The fate of chromosomal aberrations in ^{137}Cs -exposed individuals in the Goiânia radiation accident. *Health Physics* 60(1):67-70.
- Ramalho, A.T., Nascimento, A.C.H. e Natarajan, A.T. 1988. Dose assessments by cytogenetic analysis in the Goiania (Brazil) radiation accident. *Radiation Protection Dosimetry* 25(2):97-100.
- Rodrigues, A.S., Oliveira, N.G., Monteiro Gil, O., Léonard, A. e Rueff, J. 2005. Use of cytogenetic indicators in radiobiology. *Radiation Protection Dosimetry* 115(1-4):455–460.
- Romm, H., Oestreicher, U. e Kulka, U. 2009. Cytogenetic damage analysed by the dicentric assay. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità* 45(3):251-259.
- Romm, H., Wilkins, R.C., Coleman, C.N., Lillis-Hearne, P.K., Pellmar, T.C., Livingston, G.K., Awa, A.A., Jenkins, M.S., Yoshida, M.A., Oestreicher, U. e Prasanna, P.G. 2011. Biological Dosimetry by the Triage Dicentric Chromosome Assay: Potential Implications for Treatment of Acute Radiation Syndrome in Radiological Mass Casualties. *Radiation Research* 175(3):397-404.
- Roy, L., Buard, V., Delbos, M., Durand, V., Paillole, N., Grégoire, E. e Voisin, P. 2004. International intercomparison for criticality dosimetry: the case of biological dosimetry. *Radiation Protection Dosimetry* 110(1-4):471-476.

- Rueff, J., Brás, A., Cristóvão, L., Mexia, J., Sá da Costa, M. e Pires, V. 1993. DNA strand breaks and chromosomal aberrations induced by H₂O₂ and ⁶⁰Co γ-radiation. *Mutation Research* 289:197-204.
- Savage, J.R.K. 1999. An Introduction to Chromosomal Aberrations. *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology*.
- Schmid, E., Bauchinger, M., Bunde, E., Ferbert, H.F. e von Lieven, H. 1974. Comparison of the chromosome damage and its dose response after medical whole-body exposure to ⁶⁰Co γ-rays and irradiation of blood *in vitro*. *International Journal of Radiation Biology* 26(1):31-37.
- Senthamizhchelvan, S., Pant, G.S., Rath, G.K., Julka, P.K., Nair, O., Joshi, R.C., Malhotra, A. e Pandey, R.M. 2007. Biodosimetry using chromosome aberrations in human lymphocytes. *Radiation Protection Dosimetry* 123(2):241-245.
- Stephan, G., Oestreicher, U. e Romm, H. 2007. Biological dosimetry. *In Chromosomal Alterations – Methods, Results and Importance in Human Health* (Obe, G. e Vijayalaxmi eds) pp341-350, Springer-Verlag, Berlin.
- Szłuińska, M., Edwards, A. e Lloyd, D. 2007. Presenting statistical uncertainty on cytogenetic dose estimates. *Radiation Protection Dosimetry* 123(4):443-449.
- Terzoudi, G.I. e Pantelias, G.E. 2006. Cytogenetic methods for biodosimetry and risk individualisation after exposure to ionising radiation. *Radiation Protection Dosimetry* 122(1-4):513-520.
- Toledo, S.M. e Azzam, E.I. 2006. Adaptive and Bystander Responses in Human and Rodent Cell Cultures Exposed to Low Level Ionizing Radiation: The Impact of Linear Energy Transfer. *Dose Response* 4(4):291-301.
- Toxicological Profile for Cobalt 2004. United States Department of Health and Human Services, Agency for Toxic Substances and Disease Registry.
- UNSCEAR 2008. United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation Report to the General Assembly with Scientific Annexes – Volume I, New York.
- Venkatachalam, P., Solomon, F.D., Prabhu, B.K., Mohankumar, M.N., Gajendiran, N. e Jeevanram, R.K. 1999. Estimation of dose in cancer patients treated with fractionated radiotherapy using translocation, dicentrics and micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes. *Mutation Research* 429(1):1-12.
- Voisin, P., Roy, L., Hone, P.A., Edwards, A.A., Lloyd, D.C., Stephan, G., Romm, H., Groer, P.G. e Brame, R. 2004. Criticality accident dosimetry by chromosomal analysis. *Radiation Protection Dosimetry* 110(1-4):443-447.

von Sontag, C. 2007. DNA lesions induced by ionizing radiation. *In* Chromosomal Alterations – Methods, Results and Importance in Human Health (Obe, G. e Vijayalaxmi eds) pp21-38, Springer-Verlag, Berlin.

Wojcik, A., Lloyd, D., Romm, H. e Roy, L. 2010. Biological dosimetry for triage of casualties in a large-scale radiological emergency: capacity of the EU member states. *Radiation Protection Dosimetry* 138(4):397-401.

6.1. REFERÊNCIAS ELECTRÓNICAS

Dade Moeller & Associates. Radiation Safety Academy Online: online courses: Heath effects of ionizing radiation (visitado em Junho 2012)

URL 1. <http://www.radtrainonline.com/free/viewslide.asp?CourseID=91&ModuleID=351&SlideID=6251>

United States Environmental Protection Agency (visitado entre Outubro 2011 e Maio 2012)

URL 2. http://www.epa.gov/radiation/understand/health_effects.html

URL 3. <http://epa.gov/rpdweb00/understand/beta.html>

URL 4. <http://epa.gov/radiation/understand/alpha.html>

URL 5. <http://epa.gov/radiation/understand/gamma.html>

Guidelines for Using Confidence Intervals for Public Health Assessment, 2002. Washington State Department of Health (visitado entre Janeiro 2012 e Maio 2012)

URL 6. <http://www.doh.wa.gov/DataandStatisticalReports/DataGuidelines.aspx>

ANEXOS

REAGENTES

RPMI-1640 com L-Glutamina	SIGMA
Soro de bovino fetal	SIGMA
Penicilina (10000 U) e estreptomicina (10 mg/mL)	SIGMA
Heparina sódica (5000 U.I./mL)	B. Braun
Fitohemaglutinina	Gibco
Colcemida	Gibco
KCl	MERCK
Metanol	Panreac
Ácido acético glacial	Panreac
Giemsa	MERCK
Tampão fosfato 0,01 M, pH 6,8 (pastilhas)	VWR, BDH Prolabo
Entellan	MERCK

SOLUÇÕES

Solução KCl 0,56% (p/v)	5,6 g KCl, 1 L H ₂ O destilada estéril. Guardar a 4 °C.
Metanol:Ácido acético glacial (3:1)	Para 1 L: 750 mL Metanol, 250 mL Ácido acético glacial. Preparar de fresco.
Meio RPMI-1640 suplementado	Para 200 mL: 141 mL RPMI-1640 com L-Glutamina, 50 mL soro de bovino fetal, 5 mL fitohemaglutinina, 3 mL solução de penicilina (10000 U) + estreptomicina (10 mg/mL), 1 mL heparina sódica (5000 U.I./mL). Preparar de fresco.
Giemsa 4% (v/v)	4 mL Giemsa, previamente filtrado, 100 mL tampão fosfato 0,01 M, pH 6,8. Preparar de fresco.

APARELHOS E MATERIAL DE LABORATÓRIO

Autoclave	Uniclave 88, AJC
Banho	Julabo VC, 12 B
Câmara de fluxo laminar	Telstar, Modelo Bio-II-A
Centrífuga	Hettich Universal
Estufa	Termaks
Fitas pH	Macherey-Nagel
Incubadora	Heraeus, Modelo Hera Cell
Lamelas	Normax
Lâminas	Normax
Micropipetas diversas	Gilson, Orange Scientific
Microscópios ópticos	Zeiss
Pipeta	Eppendorf Multipette® 4780
Pipetas descartáveis	Greiner
Pipetas de Pasteur de vidro	Hirschmann®
Tubos 13 mL descartáveis	Greiner
Agitador	R5, new zx